植物遗传资源学报 2019，20（4）：949-959
Journal of Plant Genetic Resources DOI：10.13430/j.cnki.jpgr.20181026001

基于 SSR 标记的花椰菜和青花菜遗传多样性分析

盛小光[1]，赵振卿[1]，王建升[1]，虞慧芳[1]，沈钰森[1]，王宣怀[2]，顾宏辉[1]
（[1]浙江省农业科学院蔬菜研究所，杭州 310021；[2]浙江省武义县新宅镇农业公共服务中心，武义 321202）

摘要：选用 30 对 SSR 引物，利用毛细管电泳荧光检测技术对收集和引进的花椰菜、青花菜、宝塔菜（又叫罗马花椰菜）和近缘野生种及地方种共计 187 份材料的遗传多样性进行分析，进一步明确了花椰菜、青花菜、地方种和近缘野生种与如今栽培种间的遗传差异和亲缘关系，可为优异种质创新和新品种选育提供参考。研究结果表明：30 对 SSR 引物在 187 份材料的 DNA 样品中共扩增出 313 个等位位点，平均每对引物为 10.4333 个。依据材料的花球性状，将其分为 4 个类群即花椰菜（类群 1，P1~P81）、青花菜（类群 2，P82~P147）、宝塔菜（类群 3，P148~P154）、近缘野生种及地方种（类群 4，P155~P187）。总体来说，类群 1、2 和 3 之间的遗传多样性差异较小，类群 4 的遗传多样性最丰富。系统发育树和群体结构分析较为统一的将 187 份材料分为了 3 大组，花椰菜（G1）和青花菜（G2）被清晰地分到了两个极端，而宝塔菜与野生种聚在了一起，和地方种一起归为第 3 组（G3）。

关键词：花椰菜；青花菜；遗传多样性；群体结构

Genetic Diversity Analysis of Cauliflower and Broccoli Based on SSR Markers

SHENG Xiao-guang[1], ZHAO Zhen-qing[1], WANG Jian-sheng[1], YU Hui-fang[1], SHEN Yu-sen[1], WANG Xuan-huai[2], GU Hong-hui[1]
（[1]*Institute of Vegetables, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021*；[2]*Agricultural Public Service Center of Xinzhai Town, Wuyi County and Zhejiang Province, Wuyi 321202*）

Abstract: Studies of the genetic relationship could provide reference for the excellent germplasm innovation and new varieties breeding. Within this study, we investigated the genetic diversity by SSR markers using capillary electrophoresis fluorescence detection technology, in 187 accessions that include cauliflower, broccoli, Roman cauliflower, landraces and wild species. A total of 313 alleles were amplified from 30 pairs of SSR primers, with an average of 10.4333. According to the curd phenotypic characters of the materials, these genotypes were composed of four subgroups: cauliflower（subgroup 1, P1-81）, broccoli（subgroup 2, P82-147）, Roman cauliflower（subgroup 3, P148-154）, wild and local species（subgroup 4, P155-187）. The narrowed genetic diversity was observed among subgroups 1, 2 and 3, except subgroup 4 that showed abundant diversity. The phylogenetic tree and population structure analysis assigned these genotypes into three groups. Cauliflower（G1）and broccoli（G2）were grouped independently, while Roman cauliflower together with wild species and landraces assembled the third group（G3）.

Key words: cauliflower; broccoli; genetic diversity; population structure

收稿日期：2018-10-26 **修回日期：**2018-12-06 **网络出版日期：**2019-01-17
URL：http://www.doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20181026001
第一作者主要从事花椰菜和青花菜种质创新及分子生物学研究，E-mail：xguang@zaas.ac.cn
通信作者：顾宏辉，主要从事花椰菜和青花菜遗传育种研究工作，E-mail：guhh@zaas.ac.cn
基金项目：国家重点研发计划（2017YFD0101805，2017YFE0114500）；浙江省科技计划项目（2016C02051-5，LGN18C150010）；国家自然科学基金（31501768）；宁波市科技计划项目（2015C110008）；浙江省农业科学院扶持学科（A1）
Foundation project: National key research and development projects（2017YFD0101805，2017YFE0114500），Zhejiang science and technology planning projects（2016C02051-5，LGN18C150010），National Natural Science Foundation of China（31501768），Ningbo science and technology planning project（2015C110008），Zhejiang academy of agricultural sciences support subject（A1）

芸薹属是十字花科芸薹族46属之一，是该族中经济地位最重要的属，共有40余种作物组成[1]。甘蓝种（*Brassica oleracea* L.）是属于芸薹属的二倍体种，该类作物起源于欧洲地中海沿岸地区，由甘蓝野生种经过自然和人工的双重选择形成了不同的栽培类型，如结球甘蓝（var. *capitata* L.）、花椰菜（var. *botrytis* L.）、青花菜（var. *italic* Plenck）、苤蓝（var. *gongylodes* L.）、芥蓝（var. *alboglabra*）、羽衣甘蓝（var. *vacephala*）、抱子甘蓝（var. *gemmifera*（DC.）Zenker）[2]。花椰菜和青花菜以其独特的生殖器官——花球为商品和食用器官，含有多种维生素、矿物质、粗纤维等，特别是含有丰富的萝卜硫素，具有防癌、抗癌功效[1]。由于花椰菜和青花菜含有丰富的营养物质及独特的保健功能，近年来逐渐受到人们的青睐，栽培面积不断扩大，在蔬菜生产上占有越来越重要的地位。

具有丰富遗传多样性的种质资源是蔬菜遗传育种的基础和前提[3]。花椰菜和青花菜起源于欧洲，约19世纪中叶传入我国[4]。目前，我国虽然是世界上最大的花椰菜和青花菜的生产国和消费国，但其拥有的种质资源非常有限，遗传多样性比较狭窄，严重阻碍了优良新品种的选育，导致目前主栽的花椰菜和青花菜品种多为国外进口。因此进一步提高花椰菜和青花菜种质资源的引进力度，加强已收集资源，特别是近缘野生种质资源的遗传多样分析，对于优良新品种的培育具有重要意义。

DNA分子标记是目前应用于蔬菜种质资源遗传多样性研究的有效标记手段。SSR标记具有共显性、丰富的多态性、高度的稳定性、简便的操作性等优点，已被广泛应用于水稻[5]、小麦[6]、玉米[7]等大田作物以及番茄[8]、白菜[9]、甘蓝[10]等蔬菜作物的遗传多样性研究。近年来发展成熟的毛细管电泳荧光检测技术，是一种准确、快速和高效的SSR标记检测技术。它可以分离和识别最小1 bp差异的DNA片段，为SSR标记的基因分型提供有效的检测手段[11-12]。

虽然花椰菜和青花菜遗传多样分析前人已有过相关研究报道，但多是与其他甘蓝类蔬菜，如结球甘蓝、芥蓝和羽衣甘蓝等的联合分析。由于采用的分子标记类型不同，选用的材料群体大小及来源结构差异明显，导致试验结果的一致性不高[13-18]。至今，未见将花椰菜、青花菜及其近缘野生种和地方种进行联合分析的相关研究报道。本研究对收集的花椰菜、青花菜、宝塔菜及欧洲地中海沿岸引进的地方种和甘蓝类野生种（CC，2n=18）共计187份材料，利用毛细管电泳荧光检测的SSR标记技术进行遗传多样性分析，以期为花椰菜和青花菜种质资源的创新和开发利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究的试验材料共187份（表1），其中花椰菜材料81份（类群1），主要包括育种亲本、不同世代及杂交种材料，种质编号为1~81；青花菜材料66份（类群2），主要包括育种亲本及世代材料，种质编号为82~147；宝塔菜材料7份（又叫罗马花椰菜，类群3），主要是高世代育种材料，种质编号为148~154；从甘蓝类蔬菜起源地欧洲地中海沿岸国家收集到的花椰菜和青花菜地方种及近缘野生种材料（CC，2n=18）33份（类群4），种质编号为155~187。

1.2 DNA的提取

利用植物DNA提取试剂盒（TSP201，擎科）提取每份材料幼嫩叶片的基因组DNA，分光光度计检测质量和浓度后，储存于−70 ℃备用。

1.3 引物的设计和筛选

利用甘蓝全基因组测序信息（http://www.ocri-genomics.org/bolbase/）和Wang等[19]开发的甘蓝602对SSR引物为筛选库，从中挑选出染色体上分布较为均匀的88对SSR引物在15份不同材料中进行初筛，最终筛选出多态性相对较高的30对SSR引物进行后续试验（表2）。

1.4 PCR体系

PCR反应体系为25 μL，包含10 ng基因组DNA、2.5 μL的10×PCR buffer、1 μL 0.1 mol/L $MgCl_2$、0.5 μL的10 mmol/L dNTPs（Sigma），上、下游引物各10 ng，1.5 U的Tag DNA聚合酶。每管反应混合物覆盖20 μL矿物油，进行PCR扩增。PCR反应条件为：95 ℃变性5 min，94 ℃ 45 s、58 ℃ 45 s、72 ℃ 60 s，30个循环，72 ℃延伸10 min。

1.5 毛细管电泳荧光检测法

毛细管电泳的样品体系为10 μL，包括20倍稀释的PCR产物1.0 μL，ROX550分子量内标0.5 μL，去离子甲酰胺8.5 μL。样品混合物95 ℃变性5 min，冰浴冷却5 min后3000 r/min 离心1 min，采用ABI 3730XLDNA分析仪进行毛细管电泳检测。在检测过程中，SSR标记的DNA片段被分离并自动记录为单个基因扫描文件。使用

表 1　187 份供试材料的基本信息

Table 1　The basic information of 187 materials

编号 No.	种质名称 Germplasm name	来源 Origin	编号 No.	种质名称 Germplasm name	来源 Origin	编号 No.	种质名称 Germplasm name	来源 Origin
1	松花 60-1	高代自交系	64	佳丽佳 65-1	高代自交系	127★	青美 65	高代自交系
2★	松花 70-1	高代自交系	65★	佳丽佳 65-2	高代自交系	128	青美 70	高代自交系
3	松花 60-2	高代自交系	66	佳丽佳 65-3	高代自交系	129	青美 75	高代自交系
4	松花 65-1	高代自交系	67	佳丽佳 65-4	高代自交系	130	青美 80-1	高代自交系
5	松花 75-1	高代自交系	68	佳丽佳 65-5	高代自交系	131	青美 80-2	高代自交系
6	松花 68	高代自交系	69	优松 70-1	高代自交系	132	青美 85	高代自交系
7	必胜 80	高代自交系	70	优松 70-12	高代自交系	133	绿美 70	高代自交系
8	松花 85-1	高代自交系	71	新贵 80-1	高代自交系	134	绿贵 75-1	高代自交系
9	松花 80-1	高代自交系	72	新贵 80-2	高代自交系	135	绿贵 75-2	高代自交系
10	松花 78	高代自交系	73	新贵 80-3	高代自交系	136	绿贵 75-3	高代自交系
11	宝岛 75	高代自交系	74	松花 80-6	F_1 杂交种	137	青花 78-4	高代自交系
12	松花 90-1	高代自交系	75	松花 75-6	F_1 杂交种	138	青花 85-3	高代自交系
13	浙松 90-2	高代自交系	76	松花 80-7	F_1 杂交种	139★	青花 65-2	高代自交系
14	松花 85-2	高代自交系	77★	松花 65-5	F_1 杂交种	140	青花 95-3	高代自交系
15	松花 80-2	高代自交系	78	松花 70-4	F_1 杂交种	141	青花 100-1	高代自交系
16	松花 85-3	高代自交系	79	松花 75-7	F_1 杂交种	142	青花 100-2	高代自交系
17	松花 70-2	高代自交系	80	松花 70-5	F_1 杂交种	143	青花 75-5	DH 系
18	松花 75-2	高代自交系	81	松花 85-8	F_1 杂交种	144	青花 75-6	DH 系
19	松花 65-2	高代自交系	82	青花 90-1	高代自交系	145	青花 88-1	DH 系
20	松花 70-3	高代自交系	83	青花 85-1	高代自交系	146	青花 88-2	DH 系
21	松花 80-3	高代自交系	84	青花 60-1	高代自交系	147	青花 105	DH 系
22	松花 95	高代自交系	85	野崎 90	高代自交系	148★	RC2014-5	意大利
23	松花 85-4	高代自交系	86	青花 90-2	高代自交系	149	RC2014-6	意大利
24	紧花 120	高代自交系	87	青花 68	高代自交系	150	宝塔 1 号	世代材料
25	紧花 125	高代自交系	88	阳光 60	高代自交系	151	宝塔 2 号	高代自交系
26	紧花 100	高代自交系	89	阳光 75	高代自交系	152	罗马 1 号	高代自交系
27	紧花 130	高代自交系	90★	喜鹊 70	高代自交系	153	罗马 2 号	高代自交系
28★	台湾 80	DH 系	91	喜鹊 78	高代自交系	154	赛罗马	高代自交系
29	台湾 90	DH 系	92	青花 85-2	高代自交系	155	CV28A3	意大利
30	庆农 65	DH 系	93	青花 110	高代自交系	156★	CV43A1	意大利
31	松花 65-3	DH 系	94	报春 60	高代自交系	157	CV98A3	意大利
32	FQ85	DH 系	95★	报春 85	高代自交系	158	SG1401	意大利
33	松花 85-5	DH 系	96	青花 75-1	高代自交系	159	SG1501	意大利
34	松花 75-3	DH 系	97	野崎 100	高代自交系	160	SG1502	意大利
35	农乐 55	DH 系	98	清丰 1 号	高代自交系	161	SG1503	意大利
36	农胜 70-1	DH 系	99	秀美 65	高代自交系	162	SG1504	意大利
37	农胜 70-2	DH 系	100	清秀 80-1	高代自交系	163★	SG1505	意大利
38	农胜 70-3	DH 系	101	清秀 80-2	高代自交系	164	SG1506	意大利
39	橙松 85-1	DH 系	102	秀美 85-1	高代自交系	165	SG1508	意大利
40★	橙松 85-2	DH 系	103	秀美 85-2	高代自交系	166	SG1509	意大利
41	松花 75-4	DH 系	104	青花 95-1	高代自交系	167★	SG1510	意大利
42	浙松 80-1	DH 系	105	青花 95-2	高代自交系	168	SG1511	意大利
43	浙松 80-2	DH 系	106	青花 75-2	高代自交系	169	SG1514	意大利
44	浙松 80-3	DH 系	107★	青花 75-3	高代自交系	170	SG1515	意大利
45	松花 80-4	DH 系	108	青花 80-1	高代自交系	171	SG1520	意大利
46	松花 90	高代自交系	109	青花 80-2	高代自交系	172	SG1526	意大利
47	松花 90	高代自交系	110	青花 78-1	世代材料	173	SG1527	意大利
48	松花 75-5	高代自交系	111	青花 78-2	世代材料	174	SG1528	意大利
49	松花 85-6	高代自交系	112	青花 95	世代材料	175	SG1529	意大利
50	松花 78	高代自交系	113	清丰 1 号	世代材料	176	SG1530	意大利
51	松花 85-7	高代自交系	114	青花 65-1	世代材料	177	SG1531	意大利
52	松花 88	高代自交系	115	青花 70-1	世代材料	178	SG1532	意大利
53	大圣 140 天	世代材料	116	青花 70-2	世代材料	179	SG1533	意大利
54★	大圣 140 天	世代材料	117	青花 70-3	世代材料	180	SG1534	意大利
55	福将 140-1	高代自交系	118	秀美 75	世代材料	181	SG1535	意大利
56	福将 140-2	高代自交系	119	秀美 80	世代材料	182	SG1536	意大利
57	白雪 120-1	高代自交系	120	喜鹊 75	世代材料	183	SG1538	意大利
58	白雪 120-2	高代自交系	121	喜鹊 80	世代材料	184	SG1548	意大利
59	松花 65-4	DH 系	122	青花 60-2	世代材料	185	SG1549	意大利
60	橙松 80	DH 系	123	青花 70-4	世代材料	186	SP01	意大利
61	越优 80	高代自交系	124	青花 75-4	世代材料	187	SP12	意大利
62	越优 85	高代自交系	125	青花 78-3	世代材料			
63	松花 80-5	高代自交系	126	美球 80	世代材料			

★标注的 15 份材料为 SSR 引物初筛所选择的材料

The 15 materials marked with ★ are the materials selected for the initial screening of SSR primers

表 2 30 对 SSR 引物的位置及序列信息

Table 2 Information of 30 pairs of SSR primers used in this study

引物名称 Primers	染色体 Chromosome	遗传距离（cM） Genetic distance	正向引物（5'-3'） Forward primer	反向引物（5'-3'） Reverse primer	预期扩增片段长度（bp） Expected length
BoSF1597	C01	53.3	TTGCCAGCTTCAGACCAAG	CGATTGGAAGATCTCAGAGGA	279
BoSF1147	C01	64.6	CCCCATCGTGTTTACGATTC	AGTGGTAATTGAACCCACGC	253
BoE860	C01	80.0	AGGCGTCCGTCTACTTGTCTTTTA	CAAGAAGAAACCCACTACTCGCTC	201
BoSF2598	C01	90.1	CACAAATCGCATAACCTCCA	TATTTCCAAGGGCCAACTTG	156
BoE483	C02	7.5	CACGATAACCGGCTCCAGAA	CGTCACTTCAAACCGATGT	290
BoSF2294	C02	38.9	CACCATCGTTTCTGTCCCTT	GGAAACGGAAGGTGTGGTTA	218
BoSF239	C02	88.2	TGTGTGGAACAGTGTTTGGAA	GAGCGAAAGAGAGCCAGAGA	160
BoSF2615	C02	107.7	CGTTGTCTCAAATCAATGGC	ACCCCGATGATAATGGATGA	200
BoE904	C02	133.5	ATGGGCGGACTATCACTGTTG	GTAGAGGTGGTGGTGGTGGTGG	232
BoSF2227	C02	152.8	TTGCAGCTTCCTATCTGGCT	TGTTCCACCAGAATTCGACA	248
BoSF2385	C03	63.3	ACCTTCGTACCAACACCCAA	TTTTTGTTGGGTTCCAGGAG	257
BoSF2761	C03	83.3	GGGCTTATCTCCACCTCACA	CACCAAGTCTCCGCTTCTTC	197
BoSF004	C03	115.2	AAAAGAAGGGCTTCTCCGTC	TGCTGGATTGTTGTCTGTGG	266
BoSF1127	C03	128.5	GCAACAACACTTGCGAGAGA	GAAACAAACAGCACCAGCAA	110
BoSF1295	C03	154.3	TCAAGAGCTTTTGGCTGTCA	TGGGTAATGGGATGCAGTTT	100
BoSF1957	C04	50.7	TATGGACCACATGCCCCTAT	TTTTTGAATCCGCCCCTAGT	200
BoE648	C04	111.1	ACCAAGGCGGAGAAACAATG	TTGAGATTTTTGCTACTGCGTTG	187
BoSF1274	C04	123.5	CGAAATTGTTCAATTAGAGACAAAAA	AAGTTGGATTCTTCCGGTCC	210
BoSF2541	C05	42.9	TCTGAGGAATCGAAATTGGG	ACAACCGGACAAGTGTACGC	242
BoSF2553	C05	107.3	TGTCCACAACGCTTTGTTTC	AGAGGTTCTCCCATTGGACC	204
BoSF2791	C06	10.3	TGCACCACTCCCTGTAATCA	GGCAAACCTGAGCAAGAGAC	149
BoE118	C07	42.5	CAAGCCGTGATCGTGACAAGA	CTCCTTTCATGGGGTCTACTGCTA	192
BoSF355	C07	63.2	TCGAAAATTCGTCATCCTCC	TTTGTTCCTCCTGATGAGCA	232
BoSF2819a	C07	103.4	GACTTCCATCGAGCACCTTT	ACCGCTGAAGAGTTTCCAGT	249
BoSF1461	C08	2.7	TGCTCCTTTTTCACCGAGTT	GGAACGCAAACTAAAGTGCC	144
BoSF233	C08	101.3	GCTCAAGAGGAGTCGTCGTC	CGAGAAGGCTGATAGTTGGC	236
BoE836	C08	137.0	CTGGATATTATTACATTTGAGGTC	TCTACTACTCGACAAATGTTCTCC	203
BoSF1757	C09	35.8	TCGTCTGCCATGTCTCTCTG	CCCACCATACGATATCAGCTG	120
BoE278	C09	55.2	GGGGAAGGGACGAAATACAGGAGT	CCAACTCCATCGAAGCCCTTAAAG	337
BoSF2564	C09	93.7	TTGCTTTTGCTTCTGGGTTT	TGTTTGTGTCCGAAATCACG	226

GeneMapper V3.0 软件对基因扫描文件进行分析，根据 ROX-500 标准，自动校准尺寸和峰值。正常 SSR 等位基因或峰值出现记为“1”，而缺失的 SSR 等位基因记为“0”。

1.6 数据处理

将整理好的“1”和“0”数据输入到 Popgen Ver. 1.32 软件，计算对应引物的观察等位基因数（*Na*），有效位点数（*Ne*），Nei′s 的杂合度（*H′*）和 Shannon′s 信息指数（*I*）。利用 Powermarker V3.25 软件计算每对引物的多态性指数（*PIC*）和基因多样性（*GD*）。利用 NTSYS-PC 的 SIMQUAL 子程序，计算供试材料间的遗传距离，随后将数据输入到 MAG5 软件构建无根系统发育树。用 STRUCTURE2.3.34 软件对 187 份材料进行群体结构分析。K 值设为 1~10，运行的迭代数设置为 100000，重复次数为 500000。用 SPSS 软件进行群体 SSR 标记结果的因子分析。

2 结果与分析

2.1 SSR 等位基因扩增分析

毛细管电泳检测结果显示，30 对 SSR 引物在 187 份材料的 DNA 样品中共扩增出 313 个等位位点，平均每对引物为 10.4333 个（图 1，表 3）。不同引物扩增出等位位点数目差异较大，在 2~21 个之间，其中有 16 对引物扩增出 10 个及以上的等位位点。

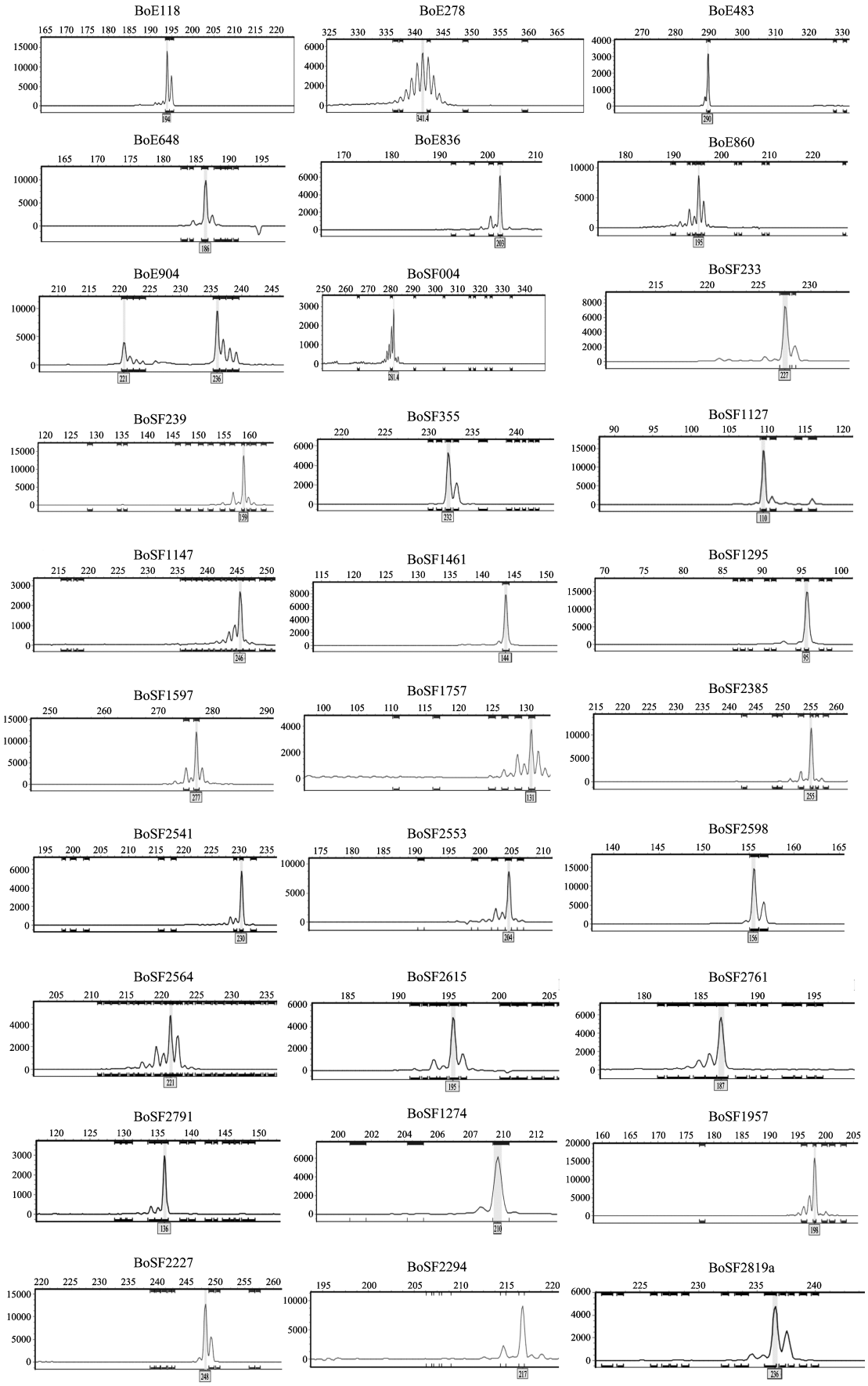


图 1　30 对 SSR 引物在花椰菜材料松花 60-1 中的毛细管电泳荧光检测图

Fig.1　Capillary electrophoresis fluorescence detection of 30 pairs of SSR primers in cauliflower material Songhua 60-1

表3 30对SSR引物PCR扩增结果

Table 3 Genetic polymorphisms of 30 pairs of SSR primers

引物编号 Primers	观察等位基因数 *Na*	有效等位基因数 *Ne*	Shannon's 指数 *I*	多态性信息含量 *PIC*	基因多样性 *GD*
BoSF004	21	4.6021	1.9535	0.7559	0.7829
BoE118	5	1.2158	0.3900	0.1680	0.1775
BoE278	14	4.2878	1.8243	0.7426	0.7668
BoE483	12	2.6771	1.2437	0.5554	0.6265
BoE648	6	2.1717	0.8930	0.4387	0.5395
BoE836	9	3.0009	1.3612	0.6106	0.6668
BoE860	13	4.7723	1.8245	0.7615	0.7905
BoE904	9	3.0129	1.3781	0.6110	0.6684
BoSF233	8	2.0330	0.9078	0.4274	0.5081
BoSF239	14	3.1501	1.5903	0.6505	0.6827
BoSF355	10	4.2820	1.7109	0.7344	0.7665
BoSF1127	2	1.2233	0.3286	0.1659	0.1826
BoSF1147	14	3.7140	1.6775	0.7039	0.7345
BoSF1274	7	1.1404	0.3371	0.1212	0.1231
BoSF1295	8	5.9254	1.8871	0.8096	0.8312
BoSF1461	3	1.0439	0.1182	0.0417	0.0421
BoSF1597	12	1.3122	0.6613	0.2350	0.2382
BoSF1757	16	4.7596	1.8752	0.7670	0.7912
BoSF1957	8	2.7986	1.2066	0.5811	0.6427
BoSF2227	14	2.8689	1.3695	0.6150	0.6607
BoSF2294	4	2.3709	0.9623	0.4927	0.5782
BoSF2385	12	3.4479	1.5200	0.6645	0.7100
BoSF2541	14	2.2039	1.2000	0.5163	0.5463
BoSF2553	8	1.5269	0.8417	0.3357	0.3451
BoSF2598	7	1.9067	0.8192	0.3960	0.4755
BoSF2564	16	4.6341	1.8755	0.7603	0.7860
BoSF2615	7	2.2158	1.0332	0.4959	0.5487
BoSF2761	12	2.9765	1.5060	0.6344	0.6643
BoSF2791	10	1.7391	0.8939	0.3957	0.4250
BoSF2819a	18	6.9218	2.2774	0.8427	0.8555
总和 Sum	313	89.9356	37.4676	16.0306	17.1571
平均 Average	10.4333	2.9978	1.2489	0.5343	0.5719

Na: Observed number of alleles, *Ne*: Effective number of alleles, *I*: Shannon's index, *PIC*: Polymorphism information content, *GD*: Gene diversity, the same as below

种质材料群体的有效等位基因数变异范围在1.0439~6.9218之间，Shannon′s指数和*GD*的平均值分别为1.2489和0.5719。30对引物扩增产物的*PIC*值变异范围在0.0417~0.8427之间，其中*PIC*值大于0.5的高多态性引物有18对，说明所选引物在187份材料群体中的扩增多态性较高。

2.2　群体的遗传多样性分析

根据187份种质材料的花球性状，包括有无、颜色和形状等，将其分为4个类群，即花椰菜（类群1，P1~P81）、青花菜（类群2，P82~P147）、宝塔菜（类群3，P148~P154）、近缘野生种及地方种（类群4，P155~P187）。对4个类群SSR标记多态性分析结果显示（表4），类群3的观察等位基因数值（*Na*）最低（3.1333），其次为类群1，再次为类群2，类群4最高；有效等位基因数（*Ne*）则类群1<类群3<类群2<类群4；Shannon′s指数（*I*）显示类群3<类群2<类群1<类群4；Nei′s杂合度（*H′*）显示类群1<类群2<类群3<类群4。总体来说，类群1、2和3之间的遗传多样性差异较小，各指标显示的排名次序略有差异，但是所有指标一致表明类群4的遗传多样性最丰富，Nei′s杂合度值高达0.6236，表明类群4没有经过高强度的人工选择。

表4　群体材料的遗传多样性比较

Table 4　Comparison of genetic diversity among the four populations

群体 Populations	观察等位基因数 *Na*	有效等位基因数 *Ne*	Shannon′s指数 *I*	Nei′s杂合度 *H′*
花椰菜 Cauliflower	4.6000	1.9829	1.0710	0.4033
青花菜 Broccoli	5.1667	2.4192	0.9562	0.4774
宝塔菜 Roman cauliflower	3.1333	2.3415	0.8852	0.5003
地方种和近缘野生种 Landeraces and related wild species	8.3000	3.5456	1.4052	0.6236

H′: Nei′s heterogeneity

2.3　群体的系统发育树构建

基于遗传距离的NJ法构建了187份材料的无根系统发育树（图2）。结果显示全部材料可划分为3个组，花椰菜和青花菜清晰地被分成了2个大组，即组G1和组G2，从地中海沿岸引进的地方种和近缘野生种分类较为复杂，宝塔菜与野生种亲缘关系较近，一起被归为第3组（G3）。总体来说，系统发育树的分类结果与表型观察结果基本吻合。G1组包含80份材料，全部为花椰菜。G2组包含61份材料，除了1份宝塔菜材料（149），其他60份材料均为青花菜。而且这份宝塔菜材料株型较为直立，叶缘浅裂，花球紧实，推测其可能来源于宝塔菜与青花菜的杂交后代。

G3组的材料表型多样化，遗传背景丰富，分类复杂。从系统发育树上可以看出G3组可分为6个分枝，其中G3-1包含的材料只有主花球，颜色多为紫色，花球大小及外形偏向于花椰菜，但花蕾结构类似于青花菜。相比于青花菜（G2），G3-1与花椰菜（G1）的亲缘关系更近。G3-2含有11份材料，其中5份地方种，4份青花菜、1份宝塔菜（148）和1份花椰菜（77）。这个分枝的材料表型上有1个共同点，就是有主花球，同时也有很多分枝及侧花球。G3-3包含5份材料，可能为半野生种，因为这5份材料均没有花球形成，分枝很多，平均每株有15~20个分枝。G3-4主要包含野生种及与野生种的杂交后代。植株高大，叶片多被毛，无花球，一般2~3年开花一次。G3-5含有7份材料，其中5份为宝塔菜，2份为青花菜；这2份青花菜（P100和P101）是遗传背景相近的姐妹系材料，株型开展，叶片宽大，生育期较长（约100 d），花球松散，蕾粒粗。推测其可能是栽培品种与较为原始的野生种或半野生种的杂交后代。G3-6的5份材料均为薹型青花菜材料，主花球较小，蕾粒粗，易抽薹且花蕾颜色均为紫色。

2.4　群体的遗传结构分析

利用软件structure2.3.4对187份材料进行群体结构分析，结果显示，△K在K=3时达到最大值，表明本群体最适分为3个类群（图3A）。如图3B所示，当K=3时，红、绿和蓝3种颜色基本可以将花椰菜、青花菜、地方种和近缘野生种区分开来，各类材料的遗传结构及分组情况与系统发育树基本一致，如花椰菜类群（红色）的遗传结构相对一致；青花菜类群（绿色）中除了100、101、117、118、138和142的遗传差异较为明显以外，其他青花菜材料的遗传相似度较高，而差异明显的这几份青花菜材料在系统发育树中和宝塔菜及多分枝的半野生种材料聚在了一起。第3类群材料（蓝色）的遗传结构最为复杂，宝塔菜和野生种的遗传结构相似。地方种

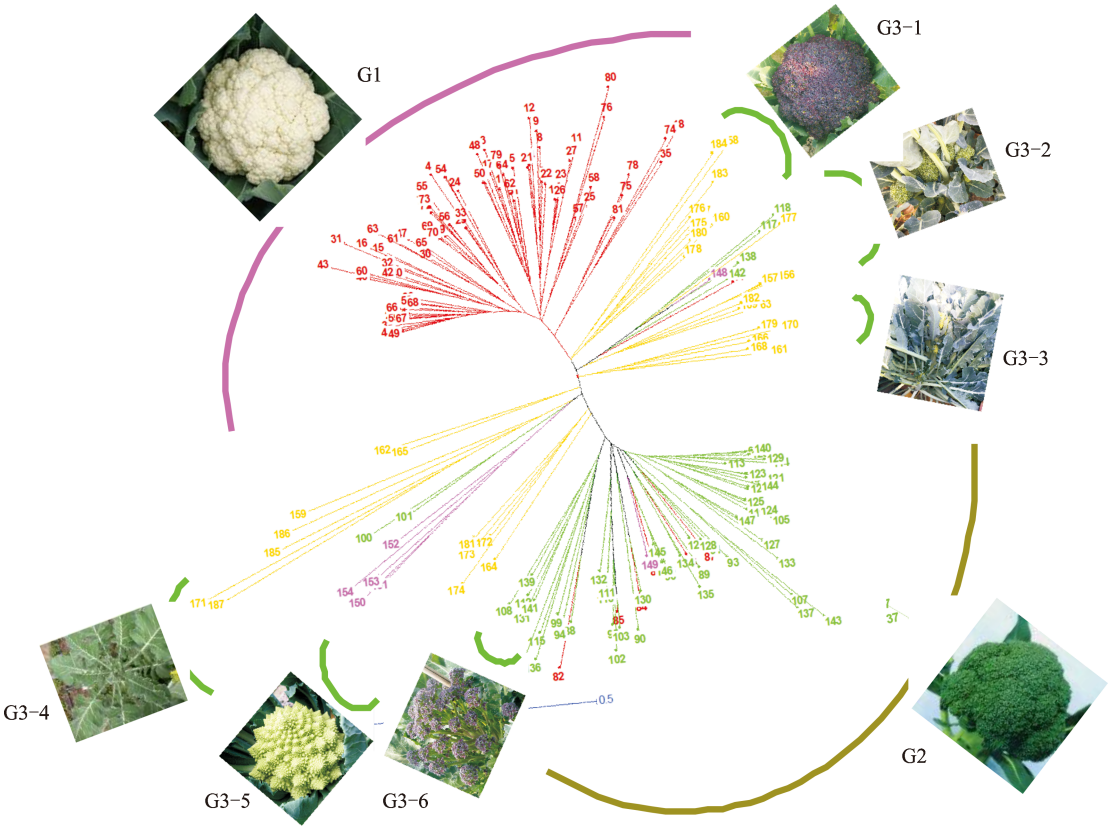


图 2 基于 SSR 分子标记的 187 份材料的聚类分析

Fig.2 Cluster analysis of 187 accessions based on SSR molecular markers

及多分枝的半野生种材料的遗传构成多样，多含有红、绿和蓝 3 种颜色，推测这部分材料是野生种到高度驯化的花椰菜和青花菜品种之间的过渡类型。因子分析结果与群体结构分析结果基本吻合，花椰菜和青花菜相对集中地分在两端，而地方种和近缘野生种的分布较为分散，表明其遗传多样性较为丰富（图 3C）。

3 讨论

3.1 SSR 标记效率

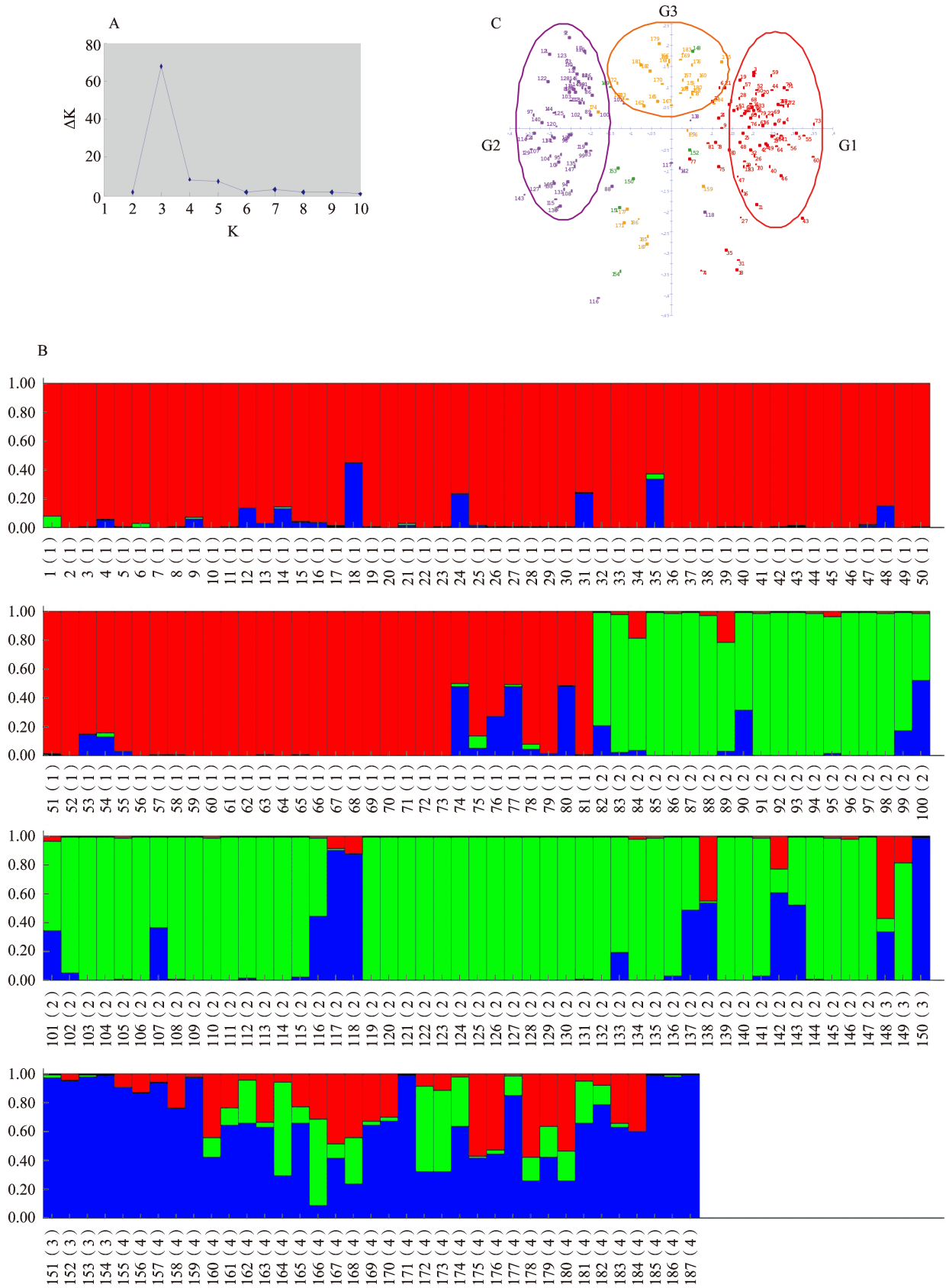
SSR 标记是共显性标记，位点具有丰富的多态性，在种内各材料之间差异明显[20-25]。随着甘蓝基因组测序工作的完成，使得甘蓝 C 基因组高通量开发 SSR 标记得以实现。本研究选取了 C 基因组 9 条染色体上分布较为均匀的 30 对 SSR 引物，利用毛细管电泳荧光检测技术对 187 份材料，包括花椰菜、青花菜及其地方种和近缘野生种进行了遗传多样性分析。30 对 SSR 引物在 187 份材料的 DNA 样品中共扩增出 313 个等位位点，平均每对引物检测到的位点高达 10.4333 个。一方面说明毛细管电泳荧光检测技术相比于传统的聚丙烯酰胺凝胶电泳技术具有更高的精确度和灵敏度，可以检测出更多的等位位点[13,26]。另一方面也说明本研究对象群体材料具有较高的遗传多样性。

3.2 群体遗传多样性

187 份材料形成的 4 个类群中，花椰菜和青花菜材料具有典型的主花球，是经过长期高强度的人工选择后形成的栽培种类型，具有较低的有效等位基因数和 Nei′s 杂合度，表明这两个类群的遗传多样性较为狭窄。宝塔菜又叫罗马花椰菜，它的花球紧实、呈圆锥形，似宝塔。宝塔菜起源于意大利，因其独特的花球外形而被选择，由于市场消费量不大，一直没有被充分利用。宝塔菜的有效等位基因数、Nei′s 杂合度和 Shannon′s 指数与花椰菜和青花菜类群相近，但其在近代没有经过高强度的人工选择。类群 4 的作物类型较为复杂，主要是从地中海沿岸收集和引进的花椰菜和青花菜地方种及近缘野生种，含有最高的 *Na*、*Ne*、*I* 及 *H′* 值，遗传多样性最丰富。

3.3 花椰菜和青花菜的起源与进化

早在 12 世纪，西班牙人 Al Awam 撰写的阿拉伯语论文中首次描述了花椰菜和青花菜的表型[27]。综合不同的文献记载，较为统一的结论是花椰菜和青花菜可能起源于地中海沿岸国家[28]。其中，意大利



A：K 值曲线图；B：群体遗传结构图；C：群体因子分析图

A：Curve diagram of K value，B：Population genetic structure，C：Population factorial analysis

图 3　187 份材料的遗传结构和因子分析

Fig.3　The genetic structure and factorial analysis of 187 accessions

被公认为是花椰菜和青花菜的遗传多样性中心，拥有大量不同的栽培类型[29-30]。芸薹属的C基因组作物中除了含有7个栽培变种外，还包括众多野生种， 如 *B. cretica*、*B. macrocarpa* 和 *B. montana* 等。这些野生种都含有2n=2x=18条染色体，并与栽培种有不同程度的有性杂交亲和性。有研究表明，花椰菜和青花菜均起源于野生种 *B. cretica*[31]，也有人认为包括花椰菜和青花菜在内的各种甘蓝类蔬菜都是由同一祖先野生型甘蓝（*B. olerecea*）进化而来的[32]，但都缺少分子生物学证据。花椰菜和青花菜的进化顺序也一直存在争论。2000年，Smith和King从分子生物学角度推测青花菜在进化时间上早于花椰菜，并且中间有过渡类型。进一步研究表明，这种过渡类型为意大利西西里岛广泛分布的紫色、薹型青花菜[33]。

从本研究的系统发育树和因子分析图上来看，花椰菜和青花菜被清晰地分到了两个极端，两者之间没有交叉。这也印证了这两个类群经过长期高强度的人工选择后，形成了相对较为独立的栽培类型。与野生种相比，从意大利引进的紫色薹型的地方种材料（G3-6）与青花菜亲缘关系更近，表明这种紫色的薹型青花菜可能是野生种向青花菜栽培种进化的一种过渡类型，从而也印证了Smith和King的观点。就亲缘关系来说，宝塔菜与野生种如 *Brassica macocapa*（CC，2n=18）等的亲缘关系最近，表明宝塔菜在进化关系上相对更原始。这一结果与姚雪琴等[34]获得的宝塔菜与花椰菜的亲缘关系最近的研究结果不一致，可能是因为材料来源及使用的分子标记不同引起的，也有可能是因为未引入野生种和地方种材料使宝塔菜的亲缘关系产生了差异。

总之，本研究选用30对SSR引物，利用毛细管电泳荧光检测技术对收集和引进的187份花椰菜、青花菜、宝塔菜、近缘野生种及地方种材料的亲缘关系进行了梳理，结果表明花椰菜和青花菜是经过长期人工选择后形成的相对较为独立的遗传群体，群体内的遗传变异丰度低。而近缘野生种和地方种材料具有丰富的遗传多样性，是花椰菜和青花菜种质创新、遗传改良和新品种培育的优良基因储备库。

参考文献

[1] Quiros C F, Farnham M W. The genetics of *Brassica oleracea*//Schmidt R, Bancroft I. Genetics and genomics of the Brassicaceae . Berlin: Springer Science Business Media, 2011: 261-289

[2] Diederichsen A. Cruciferae: Brassica//Hanelt P, Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research. Mansfeld's encyclopedia of agricultural and horticultural crops. Berlin: Springer, 2001: 1435-1446

[3] Hans E, Nicolas G. Determinants of genetic diversity. Nature Reviews Genetics, 2016, 17: 422- 433

[4] 顾宏辉，金昌林，赵振卿，盛小光，虞慧芳，王建升 . 我国松花菜产业现状及前景分析 . 中国蔬菜，2012（23）: 1-5
Gu H H, Jin C L, Zhao Z Q, Sheng X G, Yu H F, Wang J S. Status quo and prospectinfood industry in China. China Vegetables, 2012（23）: 1-5

[5] 从夕汉，施伏芝，阮新民，张效忠，罗志祥 . 东南亚62个籼型水稻亲本SSR遗传多样性分析 . 核农学报，2016，30（5）: 859-868
Cong X H, Shi F Z, Ruan X M, Zhang X Z, Luo Z X. Analysis of genetic diversity of 62 indica rice parents from southeast Asia based on microsatellite marker. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2016, 30（5）: 859-868

[6] 李正玲，胡琳，王会伟，董海滨，李艳，李春鑫，许为钢 . 河南省同名小麦地方品种SSR遗传多样性分析 . 麦类作物学报，2016，36（5）: 564-570
Li Z L, Hu L, Wang H W, Dong H B, Li Y, Li C X, Xu W G. Genetic diversity of Henan wheat landraces with the same name detected by SSR markers. Journal of Triticeae Crops, 2016, 36（5）: 564-570

[7] 易红梅，王凤格，赵久然，王璐，郭景伦，原亚萍 . 玉米品种SSR标记毛细管电泳荧光检测法与变性PAGE银染检测法的比较研究 . 华北农学报，2016，21（5）: 64-67
Yi H M, Wang F G, Zhao J R, Wang L, Guo J L, Yuan Y P. Comparison of two maize SSR detection methods: capillary electrophoresis with fluorescence detection method and denaturing PAGE silver_staining detection method. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2016, 21（5）: 64-67

[8] 刘希艳，郑峥，邓学斌，冯晶晶，白金瑞，宋燕，刘磊，李君明 . 中国加工番茄资源遗传多样性分析 . 园艺学报，2016，43（3）: 485-495
Liu X Y, Zheng Z, Deng X B, Feng J J, Bai J R, Song Y, Liu L, Li J M. Analysis the genetic diversity of processing tomato in China. Acta Horticulturae Sinica, 2016, 43（3）: 485-495

[9] 李光光，黄红弟，张华，郑岩松，李荣华 . 利用SSR分子标记研究白菜类亚种资源的遗传多样性 . 热带作物学报，2017，38（7）: 1316-1322
Li G G, Huang H D, Zhang H, Zheng Y S, Li R H. Genetic diversity analysis in Chinese cabbage［ssp. *chinensis*（L.）Makino］resources based on SSR molecular markers. Chinese Journal of Tropical Crops, 2017, 38（7）: 1316-1322

[10] 宋立晓，严继勇，曾爱松，高兵，王肖红 . 结球甘蓝遗传多样性的SSR分析 . 江苏农业学报，2013，29（1）: 151 -156
Song L X, Yan J Y, Zeng A S, Gao B, Wang X H. Analysis of genetic diversity of cabbage using SSR markers. Jiangsu Journal of Agriculture Science, 2013, 29（1）: 151-156

[11] 陈雅琼，李凤霞，李锡坤，徐军，张磊，王绍美，孙玉合 . 烟草SSR荧光标记与毛细管电泳检测技术研究 . 中国烟草科学，2011（2）: 66-70
Chen Y Q, Li F X, Li X K, Xu J, Zhang L, Wang S M, Sun Y H. Fluorescent detection and capillary electrophoresis in tobacco SSR. Chinese Tobacco Science, 2011（2）: 66-70

[12] You Q, Pan Y B, Xu L P, Gao S W, Wang Q N, Su Y C, Yang Y Q, Wu Q B, Zhou D G, Que Y X. Genetic diversity analysis of sugarcane germplasm based on fluorescence-labeled simple

sequence repeat markers and a capillary electrophoresis-based genotyping platform. Sugar Technology，2016，18（4）：380-390

［13］ 刘春晴，李光庆，姚雪琴，蔡杰，谢祝捷．基于 SSR 标记的花菜类种质亲缘关系和群体遗传结构分析．分子植物育种，2018，16（4）：1327-1337
Liu C Q，Li G Q，Yao X Q，Cai J，Xie Z J. Analysis of genetic diversity and population structure in *Brassica oleracer* based on SSR markers. Molecular Plant Breeding，2018，16（4）：1327-1337

［14］ 楼珏，张小玲，罗天宽，何婷婷，荆赞革，朱世杨，刘庆，唐征．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，2015，13（3）：605-614
Lou J，Zhang X L，Luo T K，He T T，Jing Z G，Zhu S Y，Liu Q，Tang Z. Analysis of the genetic diversity in cauliflower inbred lines by SSR and SRAP markers. Molecular Plant Breeding，2015，13（3）：605-614

［15］ 孙德岭，赵前程，宋文芹，陈瑞阳．花椰菜类蔬菜自交系基因组间亲缘关系的 AFLP 分析．园艺学报，2002，29（1）：72-74
Sun D L，Zhao Q C，Song W Q，Chen R Y. Analysis of relationships of cauliflower，broccoli and purple cauliflower by AFLP. Acta Horticulturae Sinica，2002，29（1）：72-74

［16］ Tonguc M，Griffiths P D. Genetic relationships of *Brassica* vegetables determined using database derived simple sequence repeats. Euphytica，2004，137（2）：193-201

［17］ Izzah N K，Lee J，Perumal S，Park J Y，Ahn K，Fu D H，Kim G B，Nam Y，Yang T J. Microsatellite-based analysis of genetic diversity in 91 commercial *Brassica oleracea* L. cultivars belonging to six varietal groups. Genetic Resources and Crop Evolution，2013，60（1）：1967-1986

［18］ El-Esawi M A，Germaine K，Bourke P，Malone R.Genetic diversity and population structure of *Brassica oleracea* germplasm in Ireland using SSR markers. Compyes Rendus Biologies，2016，339：133-140

［19］ Wang W X，Huang S M，Liu Y M，Fang Z Y，Yang L M，Hua W，Yuan S X，Liu S Y，Sun J F，Zhuang M，Zhang Y Y，Zeng A S. Construction and analysis of a high-density genetic linkage map in cabbage（*Brassica oleracea* L. var. *capitata*）. BMC Genomics，2012，13：523

［20］ 苏一钧，王娇，戴习彬，唐君，赵冬兰，张安，周志林，曹清河．303 份甘薯地方种 SSR 遗传多样性与群体结构分析．植物遗传资源学报，2018，19（2）：243-251
Su Y J，Wang J，Dai X B，Tang J，Zhao D L，Zhang A，Zhou Z L，Cao Q H. Genetic diversity and population structure analysis of 303 sweetpotato landraces using SSR markers. Journal of Plant Genetic Resources，2018，19（2）：243-251

［21］ 丁银灯，胡相伟，聂石辉，王仙，冯国郡，耿洪伟，郭丁．谷子种质资源表型及 SSR 遗传多样性分析．植物遗传资源学报，2018，19（6）：1210-1221
Ding Y D，Hu X W，Lie S H，Wang X，Feng G J，Gen H W，Guo D. Analysis of phenotypic traitsand SSR genetic diversity of foxtail millet germplasms. Journal of Plant Genetic Resources，2018，19（6）：1210-1221

［22］ 王舒婷，何杰丽，石甜甜，陈凌，王海岗，王瑞云，乔治军．利用微卫星标记分析山西糜子的遗传多样性．植物遗传资源学报，2019，20（1）：69-78
Wang S T，He J L，Shi T T，Chen L，Wang H G，Wang R Y，Qiao Z J. Genetic diversity analysis of broomcorn millet（*Panicum miliaceum* L.）of Shanxi province using microsatellite markers. Journal of Plant Genetic Resources，2019，20（1）：69-78

［23］ 秦岭，于淑婷，杨延兵，陈二影，孔清华，管延安.1980s-2010s 华北夏谷区主栽谷子品种 SSR 遗传多样性分析．植物遗传资源学报，2019，20（1）：221-228
Qing L，Yu S T，Yang Y B，Chen E Y，Kong Q H，Guan Y A. Genetic diversity analysis of foxtail millet varieties（*Setaria italica*（L.）P.Beauv.）released from 1980s to 2010s in summer sowing region of north China using SSR markers. Journal of Plant Genetic Resources，2019，20（1）：221-228

［24］ 张晨，云岚，李珍，王俊，郭宏宇，盛誉，石子英，徐学宝．新麦草种质的 SSR 遗传多样性及群体结构分析．植物遗传资源学报，2019，20（1）：48-59
Zhang C，Yun L，Li Z，Wang J，Guo H Y，Sheng Y. Genetic diversity and structure analysis in *Psathyrostachys Nevski* population using SSR markers. Journal of Plant Genetic Resources，2019，20（1）：48-59

［25］ 聂立圆，李爱贤，秦桢，王庆美，侯夫云，张立明．基于 SSR 标记的 132 份甘薯种质指纹图谱的构建及遗传多样性分析．植物遗传资源学报，2018，19（5）：904-911
Nie L Y，Li A X，Qing Z，Wang Q M，Hou F Y，Zhang L M. Construction of DNA fingerprints and analysis of genetic diversity based on SSR markers for 132 sweetpotato germplasms. Journal of Plant Genetic Resources，2018，19（5）：904-911

［26］ Chandra A，Grisham M P，Pan Y B. Allelic divergence and cultivar-specific SSR alleles revealed by capillary electrophoresis using fluorescence-labeled SSR markers in sugarcane. Genome，2014，57：363–372

［27］ Cubero J I. El libro de Agricultura de Al Awam. Edición comentarios sobre la traducción de Banqueri de José Ignacio Cubero Salmerón. Junta de Andalucía：，Consejería de Agricultura Pesca，2002：239-242

［28］ Kianian S P，Quiros C F. Trait inheritance，fertility and genomic relationships of some n=9 *Brassica* species. Genetic Resources and Crop Evolution，1992，39：165-175

［29］ Gray A R. Taxonomy and evolution of broccoli（*Brassica oleracea* var. *italica*）. Economic Botany，1982，36（4）：397-410

［30］ Massie I H，Astley D，King G. Patterns of genetic diversity and relationships between regional groups and populations of Italian landrace cauliflower and broccoli. Acta Horticulturae，1996，407：45-53

［31］ Gates R R. Wild cabbage and the effects of cultivation. Journal of Genetics，1953，51：363-372

［32］ Nishi S. Differentiation of Brassica crops in Asia and the breeding of Hakuran a newly synthesized leafy vegetable. Advances in Breeding，1980，12：312-318

［33］ Smith L B，King G J. The distribution of BoCAL-a alleles in *Brassica oleracea* is consistent with a genetic model for curd development and domestication of the cauliflower. Molecular Breeding，2000，6：603-613

［34］ 姚雪琴，李光庆，谢祝捷，刘春晴，龚静．长三角区域花椰菜遗传多样性及与其近缘种亲缘关系的 SRAP 分析．上海农业学报，2016，32（5）：22-27
Yao X Q，Li G Q，Xie Z J，Liu C Q，Gong J. Genetic diversity of cauliflower in Yangtze River delta region and SRAP analysis of the genetic relationship with its related species. Acta Agriculturae Shanghai，2016，32（5）：22-27