

4 种薯蓣属植物的 *psbA-trnH* 片段序列分析

郭文, 郭华春*

(云南农业大学 薯类作物研究所, 昆明 650201)

摘要:对 4 种薯蓣属(*Dioscorea*)植物——小花盾叶薯蓣(*D. sinoparviflora* C. T. Ting.)、盾叶薯蓣(*D. zingiberensis* C. H Wright.)、黄独(*D. bulbifera* L.)和薯蓣(*D. polystachya* Turczaninow)共 22 个植物类群的叶绿体 *psbA-trnH* 基因区进行 PCR 扩增并测序, 获得了该区间的完整序列, 小花盾叶薯蓣的 *psbA-trnH* 片段全长 589~593 bp, 盾叶薯蓣全长为 575~599 bp, 黄独全长为 372 bp, 薯蓣全长为 355~368 bp。将所得序列用 Bayesian 推断其系统发育关系, 结果发现 *psbA-trnH* 片段不能够完全区分 4 种薯蓣属植物种间和种内的各个分类群(不同产地), 且不能区分盾叶薯蓣与小花盾叶薯蓣; 推测薯蓣的演变过程可能与人工驯化有关, 黄独与栽培薯蓣的亲缘关系较近, 而与野生薯蓣的亲缘关系较远。

关键词:薯蓣; *psbA-trnH* 序列; 序列分析

中图分类号: Q789 **文献标志码:** A

psbA-trnH Fragment Sequence Analysis of Four Species in Genus *Dioscorea* (Dioscoreaceae)

GUO Wen, GUO Huachun*

(Institute of Root and Tuber Crops, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: Four species in genus *Dioscorea* (*D. sinoparviflora* C. T. Ting., *D. zingiberensis* C. H Wright., *D. bulbifera* L., *D. polystachya* Turczaninow), 22 taxa were amplified and sequenced the characteristic of *psbA-trnH* sequence. The length of *D. sinoparviflora* C. T. Ting., *D. zingiberensis* C. H Wright., *D. bulbifera* L. and *D. polystachya* Turczaninow fragments were 589~593 bp, 575~599 bp, 372 bp and 355~368 bp, respectively. According to the Bayesian phylogenetic tree, the *psbA-trnH* fragments couldn't identify the intraspecific and interspecific species successfully. *D. sinoparviflora* C. T. Ting. and *D. zingiberensis* C. H Wright. are also not distinguishable. We suppose the evolution of *Dioscorea* species may be related with artificial domestication. *D. bulbifera* L. is close to cultivated *Dioscorea* species.

Key words: *Dioscorea*; *psbA-trnH*; sequence analysis

薯蓣科(Dioscoreaceae)是一个古老的植物类群,薯蓣属(*Dioscorea*)植物是该科第一大属^[1],中国只有薯蓣属 1 属^[2-3]。薯蓣属植物中有许多是重要的中药材和食材,中国薯蓣属植物资源十分丰富,其中根状茎组中大多数物种都含有薯蓣皂苷元。中外研究人员主要对薯蓣属植物的宏观形态、花粉、细胞染色体、化学等方面集中地进行了研究^[4-9],结果

认为薯蓣属是一染色体数和倍性复杂并且存在许多多倍体(二倍体种、四倍体种、八倍体种等)的属^[10]。

小花盾叶薯蓣和盾叶薯蓣同属于根状茎组,其染色体数大多为二倍体和四倍体。黄独属基生翅组,在中国分布范围较广,有多个变种,其染色体数大多为八倍体。薯蓣是中国部分地区重要的食用和药用植物,其属于周生翅组,染色体数目不一。从进

收稿日期: 2013-08-23; 修改稿收到日期: 2013-10-24

基金项目: 云南省教育厅科学研究基金(2012J074)

作者简介: 郭文(1984—), 女, 在读博士研究生, 主要研究薯蓣属植物种质资源与遗传多样性研究。E-mail: guowen1509@gmail.com

* 通信作者: 郭华春, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事薯蓣类作物遗传育种学的教学与研究。E-mail: ynghe@126.com

化上讲,植物中的多倍体植物被认为是由二倍体进化而来的。综合前人研究结果,2000 年新版《中国植物志》在 1985 年版《中国植物志》的 6 组划分的基础上,结合诸多研究结果,将薯蓣属分为 8 个组^[2]。基于根状茎组的原始性^[7-11],该组植物盾叶薯蓣被认为是原始的种^[12],周生翅组植物目前被认为是薯蓣属植物进化最高级的组。

随着基因工程和分子生物学的发展,建立在 PCR 技术基础之上的 DNA 测序分析技术的开发使 DAN 分枝标记技术取得了突破性进展,具有准确性高、重复性好等优点的 DNA 片段序列法在分子标记技术中脱颖而出。

许多研究者利用分子手段对薯蓣属植物进行分子水平上的研究,为研究薯蓣属植物遗传多样性提供分子依据,也为薯蓣属药材植物的分子鉴别提供分子识别手段^[13-14]。PCR 直接测序技术则是以 PCR 扩增产物作为测序引物,极大地提高了 DNA 序列分析的效率。特别是叶绿体基因组(cpDNA)、核基因组(nDNA)、线粒体基因组(mtDNA)中的一些基因片段的序列分析,在药用植物的研究中取得了很大进展。目前国内在这些方面的研究已出现了良好的发展趋势,主要有叶绿体基因组的 rbcL、matK、psbA-trnH 与核基因组的 rDNA、ITS 等。psbA-trnH 片段是位于叶绿体 DNA 基因组上 psbA 基因和 trnH

基因之间的一段非编码序列,长约 300 bp,可用于植物组间及种间的系统发育研究^[15]。

本研究对不同组别、不同倍性和不同进化水平的小花盾叶薯蓣、盾叶薯蓣、黄独和薯蓣 4 种 22 个薯蓣属植物类群的 psbA-trnH 序列进行测定和比较,在分子水平上分析这 4 种薯蓣属植物种内和种间的遗传差异和 psbA-trnH 片段在薯蓣属植物分子系统学研究中的意义,并探索该片段在薯蓣属植物种内和种间的分子水平鉴别的可能性,为从分子水平研究这 4 种植物的亲缘关系提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

对采自非洲和云南永胜、禄丰、迪庆、漾濞、元谋以及陕西安康等地的小花盾叶薯蓣、盾叶薯蓣、黄独和薯蓣引种栽培于云南农业大学农学院实习基地,筛选比较好的株系进一步繁殖栽培,本实验取其中 17 份栽培株系及 5 份野生材料(表 1),选取生长状况良好的植株中部的健康嫩叶,去掉主脉,用 70% 乙醇擦去叶片表面的灰尘,用于提取总 DNA。

1.2 试验方法

1.2.1 总 DNA 提取 实验材料为硅胶干燥的叶片和新鲜叶片。提取方法采用改良的 CTAB 法^[16],用 4×CTAB 代替 2×CTAB 提取液,并在其中加入

表 1 材料来源

Table 1 Source of materials

编号 Code	材料名 Materials	产地 Location
1	小花盾叶薯蓣映华栽培株系 <i>D. sinoparviflora</i> cultivar Yinghua	云南永胜 Yongsheng, Yunnan
2	小花盾叶薯蓣栽培株系 B-20-6 <i>D. sinoparviflora</i> cultivar B-20-6	云南永胜 Yongsheng, Yunnan
3	小花盾叶薯蓣栽培株系 B-21-6 <i>D. sinoparviflora</i> cultivar B-21-6	云南永胜 Yongsheng, Yunnan
4	盾叶薯蓣野生种 <i>D. zingiberensis</i> wild	陕西安康 Ankang, Shaanxi
5	盾叶薯蓣池河栽培株系 <i>D. zingiberensis</i> cultivar Chihe	陕西安康 Ankang, Shaanxi
6	盾叶薯蓣红卫栽培株系 <i>D. zingiberensis</i> cultivar Hongwei	陕西安康 Ankang, Shaanxi
7	盾叶薯蓣栽培株系 A-02-6 <i>D. zingiberensis</i> cultivar A-02-6	云南永胜 Yongsheng, Yunnan
8	盾叶薯蓣栽培株系 A-05-6 <i>D. zingiberensis</i> cultivar A-05-6	云南漾濞 Yangbi, Yunnan
9	盾叶薯蓣栽培株系 A-07-3-7 <i>D. zingiberensis</i> cultivar A-07-3-7	云南永胜 Yongsheng, Yunnan
10	盾叶薯蓣栽培株系 A-9-2-1 <i>D. zingiberensis</i> cultivar A-9-2-1	云南永胜 Yongsheng, Yunnan
11	盾叶薯蓣栽培株系 A-9-3 <i>D. zingiberensis</i> cultivar A-9-3	云南永胜 Yongsheng, Yunnan
12	盾叶薯蓣栽培株系 A-9-4 <i>D. zingiberensis</i> cultivar A-9-4	云南永胜 Yongsheng, Yunnan
13	盾叶薯蓣栽培株系 A-9-5 <i>D. zingiberensis</i> cultivar A-9-5	云南永胜 Yongsheng, Yunnan
14	盾叶薯蓣栽培株系 A-10 <i>D. zingiberensis</i> cultivar A-10	云南永胜 Yongsheng, Yunnan
15	黄独非洲栽培株系 <i>D. bulbi fera</i> cultivar Linnaeus	非洲 Africa
16	黄独云南栽培株系 <i>D. bulbi fera</i> cultivar Linnaeus	云南 Yunnan
17	薯蓣天水野生种 <i>D. polystachya</i> Turczaninow wild	甘肃天水 Tanshui, Gansu
18	薯蓣咸阳栽培株系 <i>D. polystachya</i> Turczaninow cultivar	陕西咸阳 Xianyang, Shaanxi
19	薯蓣永胜野生种 <i>D. polystachya</i> Turczaninow wild	云南永胜 Yongsheng, Yunnan
20	薯蓣禄丰栽培株系 <i>D. polystachya</i> Turczaninow cultivar	云南禄丰 Lufeng, Yunnan
21	薯蓣迪庆野生种 <i>D. polystachya</i> Turczaninow wild	云南迪庆 Diqing, Yunnan
22	薯蓣元谋野生种 <i>D. polystachya</i> Turczaninow wild	云南元谋 Yuanmou, Yunnan

1% PVP 和 2% 的 β -巯基乙醇。具体操作方法如下:取 30~50 mg 的干燥叶片用液氮研磨至粉末状;移至 2 mL 的离心管,加入 1 mL 预热的 CTAB 提取液,60 °C 水浴 90 min;等体积的氯仿-异戊醇 (24:1) 萃取 2 次;70% 体积的异丙醇沉降 DNA 30 min 以上,12 000 r/min 离心;依次用 70% 的乙醇和无水乙醇各冲洗 2 次;自然风干后溶于 Elution Buffer, -20 °C 保存。

1.2.2 PCR 扩增 以总 DNA 为模板,进行叶绿体片段 *psbA-trnH* 的 PCR 扩增。扩增引物^[13]为 F₁ (GTTATGCATGAACGTAATGCTC) 和 R₁ (CGCGCATGGTGGATTCACAAATC)。

扩增反应在 Tpfferional PCR 仪上进行。反应体积 50 μ L,其中含有 dNTPmix(ATP、CTP、GTP、TTP 各 2.5 mmol/L)0.3 μ L,0.25 μ mol/L 引物 2 μ L,1 U *Taq* DNA 聚合酶 0.5 μ L 及 10 \times *Taq* 缓冲液 5 μ L,置于 PCR 仪,按下述参数进行 1 个 PCR 循环:94 °C 3 min。然后按下述参数进行 35 个 PCR 循环:94 °C 1 min;52 °C 1 min;72 °C 2 min。最后按下述参数 72 °C 延伸 5 min。取 PCR 反应液 3 μ L 于 1.5% 琼脂糖凝胶上用 1 \times TBE 电泳缓冲液于电泳仪中电泳,EB 染色,UV 灯光下照相。DNA 长度与 2 kb DNA marker 分子标记物 (TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司) 比较。

1.2.3 测序 PCR 产物经染色和 1.5% 琼脂糖电泳检测之后,送往北京六合华大基因进行 PCR 产物直接双向测序,测序引物为 PCR 引物。

1.2.4 数据分析 将测序所得的所有序列用 ClustalX^[17] 进行排序,之后在 Bioedit^[18] 中进行必要的手工排序和调整。矩阵中的空位(gap,“-”)作为缺失处理。

Bayesian 推断(BI)基于 4 种 22 个薯蓣属植物类群的 *psbA-trnH* 序列片段的序列特征信息,利用 Mr-Bayes 3.1.2 软件^[19-20] 完成系统发育树,用 jModeltest

3.06 软件^[21] 进行模型选择,Bayesian 推断起始于一棵随机树,MCMC 链 (markov chain monte caelo chains) 运行 20 万代,每 100 代取样 1 次,摒弃前 200 次老化样本,用剩余样本构建 50% 一致性树并计算各分支的后验概率(PP)^[19]。

2 结果与分析

2.1 4 种薯蓣属植物的形态特征

表 2 显示,4 种薯蓣属植物的 22 个类群除了叶子特征的差别以外,在外部形态和生长发育特征上也有明显的差别,表现在茎节间距离的大小、茎旋方向、分枝特征及根茎的分枝特点等等,这些特征有助于从外观上对其进行鉴别。

2.2 不同类群薯蓣 *psbA-trnH* 片段扩增结果

本研究对 4 种 22 个不同类群的薯蓣属植物材料在相同条件下进行 *psbA-trnH* 片段的扩增,共获得 22 个样品的 *psbA-trnH* 序列,经 1.5% 琼脂糖凝胶检测发现小花盾叶薯蓣、盾叶薯蓣均在 750 bp 左右出现扩增条带,而黄独和薯蓣则在 500 bp 左右出现扩增条带(图 1)。

2.3 22 个薯蓣属类群的 *psbA-trnH* 片段测序结果

22 个薯蓣属类群植物的 *psbA-trnH* 序列均采用 PCR 产物直接纯化测序的方法获得。将测序结果中的峰图文件应用 BioEdit^[18] 软件进行测序质量评价,并结合双向测序结果综合判断不确定的碱基,得到可信序列。从 PCR 产物直接纯化测序峰图文件中看出干扰峰背景信号弱,大多数峰为单峰,没有出现碱基误读及移码、无噪峰、套峰、杂峰,碱基信号强,每个峰唯一对应一个碱基,说明测序质量高,结果可靠,可以用于序列分析。

本研究的 22 个薯蓣属植物类群的 *psbA-trnH* 序列长度及 G+C 含量信息见表 3。

从 *psbA-trnH* 序列片段测序结果可知,小花盾叶薯蓣和盾叶薯蓣的该片段较长,小花盾叶薯蓣的

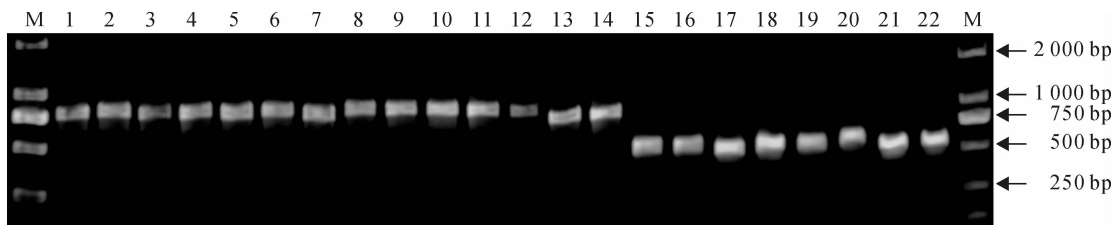


图 1 4 种 22 个类群薯蓣 *psbA-trnH* 片段扩增结果

1~22 同表 1;M. Marker;下同

Fig. 1 Amplified result of *psbA-trnH* fragments from 4 species in 22 communities

1~22 are same as Table 1;M. Marker. The same as below

psbA-trnH 片段全长为 589~593 bp,盾叶薯蓣全长为 575~599 bp;而黄独和薯蓣的该片段较短,黄独的 psbA-trnH 片段全长为 372 bp,薯蓣全长为 355~368 bp。G+C 的含量为 36.2%~37.6%,符合叶绿体 DNA 的特点。

2.4 不同类群薯蓣 psbA-trnH 序列排列比对分析结果

图 2 显示,经比对切齐加 gap 处理之后,psbA-trnH 片段总长度为 1 013 bp。测序长度为 580 bp

左右的小花盾叶薯蓣(编号 1~3)和盾叶薯蓣(编号 4~14)主要集中在 1~1 013 bp;测序长度为 350 bp 左右的部分薯蓣(编号 19、21、22)的 psbA-trnH 序列片段校正之后主要集中在 11~724 bp,为 psbA-trnH 序列的前部分;测序长度同样为 350 bp 左右的黄独(编号 15~16)和另外部分薯蓣(编号 17、18、20)的 psbA-trnH 序列片段校正之后,主要集中在 258~1 013 bp,为 psbA-trnH 序列的后部分。其中小花盾叶薯蓣(编号 1、2、3)、部分盾叶薯蓣(编号 4、

表 2 4 种薯蓣属植物的主要形态特征

Table 2 The main characteristics of 4 species of *Dioscorea*

编号 Code	叶片大小 Leaf size/cm	叶型 Leaf style	叶色 Leaf color	块茎类型 Rhizome/tuber style
1	2~10×2~8	基部宽心形,边缘整齐,膜质 Broadly cordate, margin entire, membranous	绿色夹带浅紫色 Green with purplish	横生,圆柱形,不规则分枝 Rhizome horizontal, cylindric, irregular branching
2	2~10×2~8	基部宽心形,边缘整齐,轻度膜质 Broadly cordate, margin entire, slight membranous	绿色 Green	横生,圆柱形,不规则分枝 Rhizome horizontal, cylindric, irregular branching
3	2~10×2~8	基部宽心形,边缘整齐,轻度膜质 Broadly cordate, margin entire, slight membranous	绿色 Green	横生,圆柱形,不规则分枝 Rhizome horizontal, cylindric, irregular branching
4	2~8×2~7	盾叶急尖,蜡质厚 Peltate, apex caudate-acuminate, thick wax	绿色,叶脉处黄绿色条斑 Green, yellowgreen on veins	横生,圆柱形,不规则分枝 Rhizome horizontal, cylindric, irregular branching
5	2~8×2~9	盾叶急尖,轻度蜡质 Peltate, apex caudate-acuminate, wax	绿色 Green	横生,圆柱形,不规则分枝 Rhizome horizontal, cylindric, irregular branching
6	2~7×2~9	盾叶急尖,轻度蜡质 Peltate, apex caudate-acuminate, wax	绿色 Green	横生,圆柱形,不规则分枝 Rhizome horizontal, cylindric, irregular branching
7	2~7×2~9	盾叶急尖,蜡质 Peltate, apex caudate-acuminate, wax	绿色 Green	横生,圆柱形,不规则分枝 Rhizome horizontal, cylindric, irregular branching
8	2~7×2~9	盾叶急尖,蜡质 Peltate, apex caudate-acuminate, wax	绿色 Green	横生,圆柱形,不规则分枝 Rhizome horizontal, cylindric, irregular branching
9	2~8×2~10	三角状心形急尖,厚纸质 Retriangulate cordate, apex caudate-acuminate, thick paper	绿色 Green	横生,圆柱形,不规则分枝 Rhizome horizontal, cylindric, irregular branching
10	2~8×2~9	三角状箭形,厚纸质 Retriangulate sagittate, thick paper	绿色 Green	横生,圆柱形,不规则分枝 Rhizome horizontal, cylindric, irregular branching
11	2~9×2~9	三角状箭形,厚纸质 Retriangulate sagittate, thick paper	绿色 Green	横生,圆柱形,不规则分枝 Rhizome horizontal, cylindric, irregular branching
12	2~8×2~10	三角状箭形,厚纸质 Retriangulate sagittate, thick paper	绿色 Green	横生,圆柱形,不规则分枝 Rhizome horizontal, cylindric, irregular branching
13	2~8×2~9	三角状箭形,厚纸质 Retriangulate sagittate, thick paper	绿色 Green	横生,圆柱形,不规则分枝 Rhizome horizontal, cylindric, irregular branching
14	2~8×2~10	三角状卵形,光滑,厚纸质 Retriangulate ovate, smooth, thick paper	绿色 Green	横生,圆柱形,不规则分枝 Rhizome horizontal, cylindric, irregular branching
15	13~24×12~24	卵状心形,顶端尾状 Oval cordate, caudate-acuminate	绿色 Green	卵圆形,表皮浅灰色,密生须根 Tuber ovoid, grayish, densely fibrous root
16	15~26×14~26	卵状心形,顶端尾状 Oval cordate, caudate-acuminate	绿色,叶脉处紫红色 Green, purplish red on veins	卵圆形,表皮棕黑色,密生须根 Tuber ovoid, brownish black, densely fibrous root
17	3~9×2~7	宽心形,边缘整齐,膜质 Broadly cordate, margin entire, membranous	绿色 Green	长圆柱形,垂直生长,表皮紫红色 Tuber vertical, cylindric, purplish red
18	3~9×2~7	宽心形,边缘整齐,膜质厚 Broadly cordate, margin entire, thick membranous	绿色 Green	长圆柱形,垂直生长,表皮紫红色 Tuber vertical, cylindric, purplish red
19	9~16×7~14	心形渐尖,边缘微波状 Cordate, caudate-acuminate, margin entire undulate	绿色,略带紫色 Purplish green	长圆柱形,垂直生长,表皮紫红色 Tuber vertical, cylindric, purplish red
20	3~9×2~7	宽心形,边缘整齐 Broadly cordate, margin entire	绿色 Green,	长圆柱形,垂直生长,表皮淡黄色 Tuber vertical, cylindric, faint yellow
21	2~8×2~7	戟形,发亮 Hastate, shiny	绿色 Green	长圆柱形,垂直生长,表皮紫红色 Tuber vertical, cylindric, purplish red
22	15~26×14~26	三角状卵形,边缘微波状 Retriangulate ovate, margin entire undulate	紫红色 Purple	圆锥形,垂直生长,表皮深紫色 Tuber vertical, conical, purple

注:1~22 同表 1。

Note: 1~22 be same as Table 1.

表 3 22 个薯蓣属植物类群的 *psbA-trnH* 片段长度和 G+C 含量
Table 3 *psbA-trnH* fragment length and G+C rates in 22 communities

项目 Item	编号 Code																					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
片段长度 Length/bp	593	589	590	590	590	587	599	580	587	578	575	575	576	577	372	372	367	367	368	355	366	361
G+C 含量 G+C content/%	37.0	36.9	37.1	36.9	37.0	36.0	37.0	36.9	36.7	36.6	36.6	36.8	36.6	36.7	36.6	36.7	36.8	36.7	36.9	36.2	36.8	37.6

1	A--TTT--AA	CTGT--GTT-	-G-TG-TGT-	A-----TTG-	TAT--ACCG-	----AAGT-A	AGAGT-----	-AGGGG-AAA	320
2	320
3	320
4	320
5	320
6	.AA--GG-	--AA--C	C-A--C...G	--AACG--C	-.C----T	AAAA.....	-.CCTTT	T----.T--	320
7	.AA--GG-	--AA--C	C-A--C...G	--AACG--C	-.C----T	AAAA.....	-.CCTTT	T----.T--	320
8	.AA--GG-	--AA--C	C-A--C...G	--AACG--C	-.C----T	AAAA.....	-.CCTTT	T----.T--	320
9	320
10	.AA--GG-	--AA--C	C-A--C...G	--AACG--C	-.C----T	AAAA.....	-.CCTTT	T----.T--	320
11	320
12	320
13	.AA--GG-	--AA--C	C-A--C...G	--AACG--C	-.C----T	AAAA.....	-.CCTTT	T----.T--	320
14	320
15	-A-----	320
16	-A-----	320
17	-A-----	320
18	C-A-----	320
19	.AA--GG-	--AA--C	C--C...G	.C-ACG--C	-.C----T	AAAA.....	-.CCTTT	T----.T--	320
20	-A-----	320
21	.AA--GG-	--AA--C	C--C...G	.C-ACG--C	-.C----T	AAAA.....	-.CCTTT	T----.T--	320
22	.AA--GG-	--AA--C	C--C...G	.C-ACG--C	-.C----T	AAAA.....	-.CCTTT	T----.T--	320
1	TC--CC-G--	AT-AAA--T-	-GA-----TT	-----	-AGCTAC--A	AAA-GGATT-	---T--T---	-TTTTTAG--	720
2	720
3	720
4	720
5	720
6	-----G.TC	-.C...-T.G	G...-GAA..	TTCCCC--	T...-TG-	-.C---.C	G-G-.A.ACA	A-----CA	720
7	-----G.TC	-.C...-T.G	G...-GAA..	TTCCCC--	T...-TG-	-.C---.C	G-G-.A.ACA	A-----CA	720
8	-----G.TC	-.C...-T.G	G...-GAA..	TTCCCC--	T...-TG-	-.C---.C	G-G-.A.ACA	A-----CA	720
9	720
10	-----G.TC	-.C...-T.G	G...-GAA..	TTCCCC--	T...-TG-	-.C---.C	G-G-.A.ACA	A-----CA	720
11	720
12	720
13	-----G.TC	-.C...-T.G	G...-GAA..	TTCCCC--	T...-TG-	-.C---.C	G-G-.A.ACA	A-----CA	720
14	720
15	-.AA--T-	-.C...A--	G...-GAA..	TT-----	T...-G-	-.C---.C	-G.CA--C-	A-----C-	720
16	-.AA--T-	-.C...A--	G...-GAA..	TT-----	T...-G-	-.C---.C	-G.CA--C-	A-----C-	720
17	-.AA--T-	-.C...A--	G...-GAA..	TT-----	T...-G-	-.C---.C	-G.CA--C-	A-----C-	720
18	-.AA--T-	-.C...A--	G...-GAA..	TT-----	T...-G-	-.C---.C	-G.CA--C-	A-----C-	720
19	-.AA--T-	-.C...A--	G...-GAA..	TT-----	T...-G-	-.C---.C	-G.CA--C-	A-----C-	720
20	-.AA--T-	-.C...A--	G...-GAA..	TT-----	T...-G-	-.C---.C	-G.CA--C-	A-----C-	720
21	-.AA--T-	-.C...A--	G...-GAA..	TT-----	T...-G-	-.C---.C	-G.CA--C-	A-----C-	720
22	-.AA--T-	-.C...A--	G...-GAA..	TT-----	T...-G-	-.C---.C	-G.CA--C-	A-----C-	720
1	-ATGTAG--C	C-AAGT-GG-	---T-AAG--	-----	-----	-----	-----	-----	1013
2	-A-----	-----	-----	-----	-----	-----	1013
3	-A-----G	-----	-----	-----	-----	1013
4G	-----	-----	-----	-----	1013
5	-A-----	-----	-----	-----	-----	-----	1013
6	C-----GT-	.T...-A..G	AAG-----	-T	T--G--AG	--CA--TT	AA-	-----	1013
7	C-----GT-	.T...-A..G	AAG-----	GT	-G--AG	--CA--T-	AAA	-----	1013
8	C-----GT-	.T...-A..G	AA-----	GT	-GG--	-----	-----	-----	1013
9	1013
10	C-----GT-	.T...-A..G	AA-----	GT	-GGG--A-	--CCA--	-----	-----	1013
11	1013
12	1013
13	C-----GT-	.T...-A..G	AA-----	-----	-----	-----	-----	-----	1013
14	1013
15	-A-----G	-CA-G-T-G	G--A-----	-----	-----	1013
16	-A-----G	-CA-G-T-G	G--A-----	-----	-----	1013
17	-A-----G	-CA-G-T-G	G--A-----	-----	-----	1013
18	-A-----G	-CA-G-T-G	G--A-----	-----	-----	1013
19	-A-----G	-CA-G-T-G	G--A-----	-----	-----	1013
20	1013
21	1013
22	1013

图 2 22 个薯蓣属植物类群的 22 条 *psbA-trnH* 片段具代表性的序列排列

Fig. 2 Representative sequence alignment of *psbA-trnH* fragment regions of 22 communities

5、9、11、12、14)、黄独(编号 15、16)和部分薯蓣(编号 17、18、20)的起始密码子为 ATG,而其余盾叶薯蓣(编号 6、7、8、10、13)和剩余部分薯蓣(编号 19、21、22)的起始密码子为 ATT。

2.5 基于 Bayesian 推断的 22 个薯蓣属植物类群的系统分枝树

经 Modeltest 软件计算 *psbA-trnH* 序列矩阵的最适合模型为: F81[Base=(0.312 2, 0.181 6, 0.185 0,

0.321 2), Nst=1, Rates=equal, Pinvar=0]。基于序列特征及建树最适模型,根据 22 个类群的序列特征用 Bayesian 推断的系统分枝树(图 3)。小花盾叶薯蓣和盾叶薯蓣种内的各个类群的薯蓣聚类成一个大的分支,其中小花盾叶薯蓣(编号 1~3)和部分盾叶薯蓣(编号 4、5、9、11、12、14)聚成一支,支持率为 99%。黄独(编号 15~16)和薯蓣(编号 17、18、20)聚为一小支,支持率为 99%,其中薯蓣的 3 个类群(17、18、20)在内部聚为一支,支持率为 99%。其余的几个薯蓣类群(编号 19、21、22)聚为一支,支持率为 100%,在此基础上又与黄独及与黄独聚成一支的薯蓣聚为一个大的分支,支持率仅为 65%。

3 讨论

薯蓣属植物是一染色体数目和倍性复杂且存在许多多倍体的属,本研究所采用的薯蓣属植物类群(产地)彼此之间的地域距离相隔比较大,倍性复杂[其中已知小花盾叶薯蓣 $2n=2x=20$,盾叶薯蓣 $2n=2x=20,40$,黄独 $2n=80$,薯蓣(禄丰栽培株系) $2n=144$]^[22]。多个性状(核型、花粉形状、叶表皮气孔、地下茎类型等)研究^[23]结果也认为薯蓣属内的性状显示了其从原始到进化的演化过程。在薯蓣属内部,尽管 *psbA-trnH* 提供的信息有限,本研究 4 种薯蓣属植物(且盾叶薯蓣和小花盾叶薯蓣同属于根状茎组,黄独属于基生翅组,薯蓣属周生翅组)涵盖了目前薯蓣属植物 8 个分组的 3 个组别,其倍性也为二倍体、四倍体、八倍体及 144 条染色体的非整

倍体,其形态特征也十分多样,因此所得各类群 *psbA-trnH* 序列具有很好的代表性,可以反映 *psbA-trnH* 序列在这 4 个种、不同组别及不同倍性的特征。

本研究在 *psbA-trnH* 片段的扩增过程中都曾扩增检测得到一明一暗 2 个条带,其中小花盾叶薯蓣和盾叶薯蓣的 2 个条带位置分别为明带 750 bp 左右,暗带 300 bp 左右,黄独和薯蓣的 2 个条带位置分别为明带 350 bp 左右,暗带 100 bp 左右。其中盾叶薯蓣的明暗 2 条带与孙华钦等^[13]研究的结果相似,且孙华钦等^[13]研究的植物同属于薯蓣属根状茎组植物,其研究也确认了盾叶薯蓣明暗 2 个条带均为 *psbA-trnH* 序列^[13],属于不同的叶绿体 DNA 上,但当本研究再次扩增后进行检测则 22 个植物类群均没有暗带出现;另 Sun 等^[14]研究了中国薯蓣属整个属内的植物类群的 *psbA-trnH* 序列,均只有 1 条长度均为 282 bp 左右的条带,这与本研究及孙华钦等^[13]的研究结果都不相同。

psbA-trnH 序列对本研究的 22 个分类群的系统关系分辨力不高,不过对该序列碱基排列分析及系统树的分析我们仍然可以得到一些有价值的结论。本研究结果发现小花盾叶薯蓣和盾叶薯蓣的 *psbA-trnH* 片段较长,而黄独和薯蓣的该片段较短,*psbA-trnH* 片段序列排列后发现部分薯蓣的片段集中在序列校正排列的前部分,而黄独和其余部分薯蓣的片段集中在序列校正排列的后部分。这与前人研究认为薯蓣属植物是从根状茎组(且小花盾叶薯蓣和盾叶薯蓣被认为是该属植物的最原始的种)逐渐演化为更高级的组^[2,7,11-12,24],如基生翅组(如黄独)和周生翅组(如薯蓣),孙华钦等^[13]也认为 *psbA-trnH* 片段处于编码序列的基因间区,在进化上很自由,据此推测,该属植物在演化的过程中,*psbA-trnH* 片段是在不同组别、不同倍性上呈逐渐缩短的趋势。这也需要集中该属更多组别、倍性的物种进行深入的研究才能确定。

国内 Sun 等^[14]在研究中国薯蓣属植物的 DNA 条形码时采用了叶绿体 DNA 的 *psbA-trnH* 序列片段,发现该片段能够胜任薯蓣属植物种间的分类,但与 *matK*、*rbcL* 以及 *trnL-F* 序列相比,其区分能力最弱。孙华钦等^[13]2006 年报道了叶绿体 DNA 的 *psbA-trnH* 片段用于薯蓣属穿龙薯蓣、黄山药和盾叶薯蓣 3 种植物种间的分类,也认为叶绿体 *psbA-trnH* 片段可以用于种间的分类,不过不能区分种以下的分类群,这是由于 *psbA-trnH* 片段长度有限,

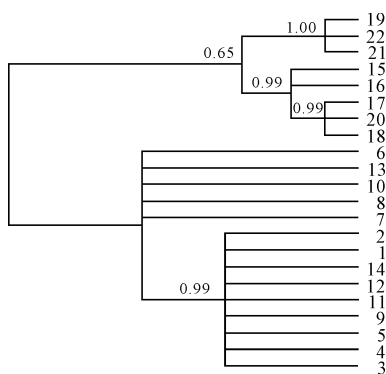


图 3 Bayesian 推断的 22 个薯蓣属植物类群的系统分枝树
图中数字为 PP 值,PP 值为 BI(Bayesian Inference)
的后验概率,PP ≥ 0.9 (90%)具可置信度

Fig. 3 Phylogenetic tree of 22 communities
by Bayesian inference

The numbers in the figure above the branches are PP,
PP is posterior probability of Bayesian inference.
PP ≥ 0.9 (90%)represent reliability

不能提供太多的遗传信息所致。本研究的结果支持以上两种说法,同时本研究结果也支持该片段碱基组成上 G+C 含量较低的特点。本文基于序列特征和系统发育树发现 psbA-trnH 序列不能区分盾叶薯蓣和小花盾叶薯蓣 2 个种,小花盾叶薯蓣是近几年从盾叶薯蓣种内才通过形态学上的细微差别(小花盾叶薯蓣的花较盾叶薯蓣的花小)鉴别开来的^[7],而 GAO 等^[24]也基于小花盾叶薯蓣和盾叶薯蓣的主

要分布认为盾叶薯蓣是小花盾叶薯蓣因地理隔离而演化形成的,足以说明这 2 个种的亲缘关系很近。本研究发现几个栽培的薯蓣聚在一支,且与黄独的遗传距离很近;而另几个野生薯蓣聚为一支,据此推测薯蓣的演变过程是与人工驯化存在很大关系的,且推测黄独与栽培薯蓣的亲缘关系较近,而与野生薯蓣的亲缘关系较远。

致谢:本研究过程中得到了云南省教育厅科学研究基金的资助,同时感谢中国科学院昆明植物研究所工作人员谭英的热心指导和帮助。

参考文献:

- [1] COURSEY D G, YAMS. An account of the nature, origins, cultivation and utilization of the useful members of Dioscoreaceae[M]. Tropical Agriculture Series. Longmans, Green and Co. Ltd. London, 1967.
- [2] DING ZH Z, GILBERT M G. Dioscoreaceae[M]//WU Z, RAVEN P H. Flora of China, Beijing: Science Press, 2000, 24: 276—296.
- [3] 徐成基. 中国薯蓣资源[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 2000: 1—349.
- [4] KNUTH R. Dioscoreaceae[M]//ENGLER A. Das Pflanzenreich. Leipzig: Wilhelm Engelmann, 1924, 87(IV, 43): 1—387.
- [5] KNUTH R. Dioscoreaceae[M]//Die Natürliche pflanzenfamilien. Leipzig: Wilhelm Engelmann, 1930: 438—462.
- [6] PRAIN D, BURKILL I H. An account of the genus *Dioscorea* in the east[M]. Dhaka: Bengal Government Press, 1936: 1—85.
- [7] PEI J(裴 鉴), DING ZH Z(丁志遵), QIN H ZH(秦慧贞), et al. A preliminary systematic study of *Dioscorea* L. sect. *stenophora* Uline [J]. *Journal of Systematics and Evolution* (植物分类学报), 1979; 61—72(in Chinese).
- [8] DING ZH Z(丁志遵), ZHANG M ZH(张美珍). New taxa of Dioscoreaceae in China[J]. *Journal of Systematics and Evolution* (植物分类学报), 1982, 2: 205—209(in Chinese).
- [9] QIN H ZH(秦慧贞), ZHANG M ZH(张美珍), LING P P(凌萍萍), et al. A cytotaxonomic study on Chinese *Dioscorea* L. —the chromosome numbers and their relation to the origin and evolution of the genus[J]. *Journal of Systematics and Evolution* (植物分类学报), 1985; 11—18(in Chinese).
- [10] WAN J R(王金荣), DING ZH Z(丁志遵), QIN H ZH(秦慧贞), et al. A phytogeographical study on the family Dioscoreaceae[J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报), 1994, 14(2): 128—135(in Chinese).
- [11] 张美珍. 南京中山植物园研究论文集[C]. 南京: 江苏科学技术出版社, 1982: 1—10.
- [12] 秦慧贞, 李碧媛, 吴竹君. 中国植物学会五十五周年年会学术论文摘要汇编[C]. 北京: 中国植物学会, 1988: 307—308.
- [13] SUN H Q(孙华钦), LUO K(罗 科), et al. psbA-trnH fragment sequence analysis of *Dioscorea nipponica*, *D. panthaica* and *D. zingiberensis*[J]. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology* (应用与环境生物学报), 2006, 12(6): 792—797(in Chinese).
- [14] SUN X Q, ZHU Y J, GUO J L, et al. DNA barcoding the *Dioscorea* in China, a vital group in the evolution of monocotyledon; Use of *matK* gene for species discrimination[J]. *Plos One*, 2012, 7(2): 1—7.
- [15] TIAN X(田 欣), LI D ZH(李德铎). Application of DNA sequences in plant phylogenetic study[J]. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), 2002, 24: 170—184(in Chinese).
- [16] DOYLE J J, DOYLE J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. *Phytochemical Bulletin*, 1987, 19: 11—15.
- [17] THOMPSON J D, HIGGINS D G, GIBSON T J. Clustal X multiple sequence alignment program(version 1. 83). Bethesda, Maryland: National Center for Biotechnology Information, 1998.
- [18] HALL T A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows95/98/NT[J]. *Nucleic Acids Symposium Series*, 1999, 41: 95—98.
- [19] HUELSENBECK J P, RONQUIST F. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees[J]. *Bioinformatics*, 2001, 17: 754—755.
- [20] RONQUIST F, HUELSENBECK J P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models[J]. *Bioinformatics*, 2003, 19: 1572—1574.
- [21] POSADA D, CRANDALL K A. Modeltest: testing the model of DNA substitution[J]. *Bioinformatics*, 1998, 14: 817—818.
- [22] 黄贤兰. 4 种薯蓣属植物的 SSR 分析及其染色体核型比较[D]. 昆明: 云南农业大学, 2011.
- [23] HANG Y Y(杭悦宇), XU L SH(徐璐珊), SHI D R(史德荣), et al. Morphological features and its taxonomic significance of starch grain in subterranean organ of *Dioscorea* L. in China[J]. *Journal of Plant Resources and Environment* (植物资源与环境学报), 2006, 15(4): 1—8(in Chinese).
- [24] GAO X, ZHU Y P, WU B CH, et al. Phylogeny of *Dioscorea* sect. *Stenophora* based on chloroplast *matK*, *rbcl* and *trnL-F* sequences[J]. *Journal of Systematics and Evolution* (植物分类学报), 2008, 46(3): 315—321(in Chinese).