

山药种质资源核糖体 rDNA-ITS 区序列分析

吴志刚^{1*}, 范传颖^{1,2}, 包晓青^{1,2}, 陶正明^{1*}, 姜武¹

1. 浙江省亚热带作物研究所, 浙江 温州 325005

2. 温州医科大学, 浙江 温州 325035

摘要: 目的 分析 14 种山药 *Dioscoreae Rhizoma* 种质 ITS 序列, 为山药种质资源分子鉴别和进化关系研究提供依据。方法 PCR 克隆扩增 ITS 序列并进行双向测序, Clustal X (v1.83) 软件进行序列比对, Mega(V4.1) 计算序列核苷酸比例及遗传距离, 并构建邻接树 (Neighbor-joining, NJ) 和最大简约树 (Maximum parsimony, MP)。结果 14 种山药种质 ITS 序列全长为 558~594 bp, 其中 ITS1 长度为 141~165 bp, ITS2 长度为 146~158 bp; ITS 序列存在大量的转换、颠换, 转化/颠换比率为 5.347, ITS1 和 ITS2 序列均显示 102 个变异位点; 14 种山药种质 K2-P 遗传距离为 0~0.517 2; 薯蓣 *Dioscorea opposita*、褐苞薯蓣 *Dioscorea persimilis*、日本薯蓣 *Dioscorea japonica* 关系亲密, 组成单一支系; 参薯 *Dioscorea alata* 与山薯 *Dioscorea fordii* 关系亲密, 聚为另一分支, 并位于发育树基部。结论 ITS 序列系统树为澄清山药类资源进化关系奠定了基础, 序列中丰富的变异位点为多基原山药鉴别提供了科学依据。

关键词: 山药; ITS; 亲缘关系; 系统进化; 分子鉴定

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)08-1136-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.08.018

Sequence analysis on rDNA-ITS region of germplasm resources from *Dioscoreae Rhizoma*

WU Zhi-gang¹, FAN Chuan-ying^{1,2}, BAO Xiao-qing^{1,2}, TAO Zheng-ming¹, JIANG Wu¹

1. Zhejiang Institute of Subtropical Crops, Wenzhou 325005, China

2. Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China

Abstract: Objective To provide the scientific evidence for molecular identification and phylogenetic evolution by analyzing internal transcribed spacer (ITS) sequences in 14 different germplasms from *Dioscoreae Rhizoma*. **Methods** The ITS regions were cloned by PCR amplification and sequenced bi-directionally. The ITS sequences were aligned using Clustal X software (version 1.83), the genetic distances were calculated using Mega software (version 4.1), and the phylogenetic trees were constructed through the Neighbor-joining (NJ) and maximum parsimony (MP) methods. **Results** The length of ITS sequences obtained ranged from 558 to 594 bp, of which ITS1 was from 141 to 165 bp and ITS2 was from 146 to 158 bp. There were a lot of transitions and transversions in ITS sequences, and the transition/transversion ratio among 14 different germplasms was 5.347. Both in ITS1 and ITS2, 102 variable sites were further observed. The kimura 2-parameter (K2-P) genetic distance among 14 different germplasms ranged from 0 to 0.517 2. The phylogenetic trees suggested that there were close genetic relationship among *Dioscorea opposita*, *D. persimilis*, and *D. japonica*, they grouped closely into Clade I; Furthermore, *D. alata* and *D. fordii* also shared a closer genetic relationship comprised another clade (Clade II). **Conclusion** The phylogenetic analyses based on ITS sequences can present a foundation for clearing the evolution of germplasm resources in *Dioscoreae Rhizoma*; The variable bases can also provide reliable molecular evidences for identifying different genotypic germplasms of *Dioscoreae Rhizoma*.

Key words: *Dioscoreae Rhizoma*; ITS sequence; genetic relationship; phylogenetic evolution; molecular identification

收稿日期: 2013-12-06

基金项目: 浙江省重点实验室项目 (2011E10015); 温州市科技项目 (N20100003)

作者简介: 吴志刚 (1979—), 男, 博士, 助理研究员, 从事中药资源与药材质量研究。

*通信作者 吴志刚, 助理研究员。E-mail: wuzhigang177@126.com

陶正明, 副研究员。E-mail: zmtao2002@yahoo.com.cn

网络出版时间: 2014-03-17 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.7501/j.issn.0253-2670.2014.08..html>

山药 *Dioscoreae Rhizoma* 为薯蓣属 *Dioscorea* L. 周生翅组 (*Enantiophyllum* Uline) 植物, 在热带与亚热带地区广泛作为一年生作物生产, 供人们食用与药用^[1]。我国是山药重要的驯化中心之一^[2], 始载于《山海经》, 唐代《四时纂要》则有山药用种薯节段栽培及制粉的记载^[3], 宋代《图经本草》与《求薯蓣苗》, 明代《本草纲目》、清代《植物名实图考》等书籍中均有山药生产利用的记载^[4]。迄今, 薯蓣 (怀山药) *Dioscorea opposita* Thunb.、参薯 (淮山) *Dioscorea alata* L.、褐苞薯蓣 (广西山药) *Dioscorea persimilis* Prain et Burkill、山薯 (广东山药) *Dioscorea fordii* Prain et Burkill 4 种山药资源在我国大面积栽培生产^[5]。关于山药类群的进化关系, 有学者认为普通山药 *Dioscorea batatas* Decne. 原产中国亚热带地区, 是由日本薯蓣 *Dioscorea japonica* Thunb. 演化而来^[6]; 而参薯则可能原产孟加拉湾, 后经流通分布至东南亚, 被认为国外亲缘野生种 *Dioscorea Hamiltonii* Hook. f. 与褐苞薯蓣杂交形成^[7]; 山薯可能是野生种长期家化栽培形成^[8]; 褐苞薯蓣被认为是薯蓣的一个种内变异类型^[9]。可见, 我国山药的资源进化关系仍存在很多疑点, 需更多植物系统发育理论支撑。

植物核糖体 DNA (rDNA) 是由串联重复排列的单位组成, 每个单位包括编码区和非编码的内

转录间隔区。其中, 内转录间隔区 (internal transcribed spacer, ITS) 由于所受的选择压力小、进化速率较快、稳定性好、测序方便, 是研究植物属间、种间、甚至种内等较低分类阶元系统发育的重要基因片段^[10]。目前, ITS 序列在中药资源近缘物种鉴定、种内不同品种遗传差异分析、种内系统发育等方面广泛应用^[11-12]。在薯蓣属种间系统发育关系上, 前人曾利用 *trnL-F*、*matK*、*rbcL* 序列评价^[13-14], 认为中国台湾与内地分布的薯蓣属植物符合 Ding 等^[15]经典分类方法处理, 该研究为薯蓣属植物系统发育提供了一定依据。但对于我国众多山药资源种间、种内的分子发育与鉴别, 仍缺乏相应研究。本实验通过收集国内不同种、及种下山药种质资源, 运用 ITS 序列揭示分子系统发育关系, 以期为我国山药资源系统进化及鉴别提供科学依据。

1 材料与试剂

1.1 材料

以薯蓣 *Dioscorea opposita* Thunb. 及 3 个近缘种参薯 *D. alata* L.、山薯 *D. fordii* Prain et Burkill、褐苞薯蓣 *D. persimilis* Prain et Burkill 种内的 14 种山药种质为材料, 野外采集新鲜嫩叶, 立即用变色硅胶快速干燥密封, 室内置于 -20 °C 下低温保存。所有材料均由浙江省亚热带作物研究所李林研究员鉴定, 见表 1。

表 1 材料信息

Table 1 Information of materials

种质	编码	物种	采集地	种质	编码	物种	采集地
铁棍山药	TIS	薯蓣 <i>D. opposita</i>	河南温县	长汀小薯	CTS	薯蓣	福建南平
太谷山药	TGS	薯蓣	河南温县	乐南小薯	LNS	薯蓣	福建南平
花籽山药	HZS	薯蓣	河南温县	南平山药	NPS	薯蓣	福建南平
白玉山药	BYS	薯蓣	河南温县	白圆参薯	BSY	参薯 <i>D. alata</i>	浙江乐清
清源山药	QYS	薯蓣	河南温县	紫参薯	ZSY	参薯	浙江瑞安
水晶山药	SJS	薯蓣	河南温县	广东山药	GDS	山薯 <i>D. fordii</i>	浙江瑞安
海南山药	HNS	薯蓣	福建南平	广西山药	GXS	褐苞薯蓣 <i>D. persimilis</i>	浙江瑞安

1.2 试剂

Tris 碱, EDTA, DNTP mix *Taq* DNA pol 缓冲液 (10 × PCR 缓冲液, 含 Mg^{2+}), *Taq* DNA polymerase (上海 SANGON 公司), ITS 扩增引物 (深圳华大基因), 琼脂糖 (上海 SANGON 公司), 其他试剂均为分析纯。PCR 扩增产物纯化试剂盒 (BIO BASIC INC)。

2 方法

2.1 总 DNA 提取、PCR 扩增

DNA 采用优化的 CTAB 法提取^[16]。DNA 样品经稀释后 -20 °C 保存备用。0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 提取效果。ITS 扩增引物由杭州华大基因公司合成, ITS-F: 5'-TCCTCCGCTTATTGATAT CG-3', ITS-R: 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAAC AAGG-3'。

PCR 扩增反应体系 20 μL : 其中 10 $\times$ 缓冲液 (含 Mg^{2+}) 2.0 μL , dNTP mix (dATP、dCTP、dGTP、dTTP 各 2.5 nmol/L) 1.6 μL , 上下游引物 (10 mmol/L) 各 1 μL , 5 U *Taq* 酶 0.2 μL , 模板 (20 ng/L) 2.0 μL , ddH₂O 补齐至 20 μL 。置于 PCR 热循环仪上 (德国 EPPENDORF 公司), 经 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min 后; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 53 $^{\circ}\text{C}$ 复性 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s, 完成 35 个循环后; 72 $^{\circ}\text{C}$ 下延伸 5 min。

2.2 目的片段的回收及测序

取 PCR 产物 20 μL 于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳仪检测, 选取明亮目的条带, 消毒刀片切取并用 DNA 凝胶提取试剂盒纯化回收, 连接到 PMD-18 载体 (Takara 公司), 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 经 X-gal/IPTG 平板筛选, 从蓝/白菌落中挑选白色菌落提取质粒按 “2.1” 项方法进行 PCR 扩增验证, 确定含有效插入的克隆。选取具有阳性效果的菌液, 送至杭州华大基因公司进行测序, 为确保序列的正确, 每个样品至少送样 3 份。

2.3 序列数据分析

Clustal X (version 1.83) 对 14 种山药种质序列进行比对, Mega version 4.1 修剪整齐并去除缺陷 (gap), 统计各序列核苷酸组成比例及遗传距离, 遗传距离采用 Kimura two-parameter (K2-P) 模型评价。以根状茎组 (*Stenophora Uline*) 的粉背薯蓣 *Dioscorea colletii* HK. f. var. *hypoglauca* (Palibin) Pei et C. T. Ting (DQ267931) 为外类群, Mega (version 4.1) 软件中采用邻接法 (Neighbor joining, NJ) 和最大简约法 (Maximum parsimony, MP) 构建山药资源分子系统发育树, 树状图中每一分支进行靴带分析 (bootstrap), 自展重复数设定为 1 000 次, 以评价树状图的可行性。

3 结果与分析

3.1 PCR 扩增

PCR 扩增产物直接测序易受引物无法验证的影响, 降低测序准确度。实验采用克隆方法获取 14 种山药种质的 ITS 序列 (包含 18 S rDNA、ITS1、5.8 S rDNA、ITS2 和 26 S rDNA), PCR 检测 600 bp 左右清晰条带 (图 1), 与预期片段大小相符合, 即为目的条带, 可作测序使用。

3.2 ITS 序列长度

14 种山药种质序列经过校正后, 在 NCBI 上进行 Blast 相似性搜索, 确定序列为目标序列。结果

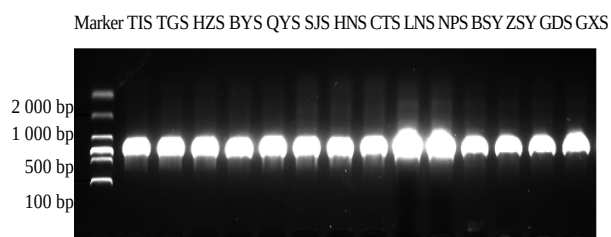


图 1 14 种山药种质 ITS 序列的 PCR 扩增图谱

Fig. 1 PCR amplification of ITS sequence from 14 germplasms of *Dioscoreae Rhizoma*

表明, 14 种山药种质 ITS 序列具有较高同源性, 长度以乐南山药最短 (558 bp), 铁棍山药、太谷山药、花籽山药等 7 种山药种质最长 (594 bp) (表 2)。根据 NCBI 中近缘种日本薯蓣 *D. japonica* (FJ860085) 序列范围, 界定出 ITS1、ITS2 及其他部分序列的区域 (表 2)。其中, ITS1 长度为 141~165 bp; ITS2 长度为 146~158 bp; 5.8 S 具有高度保守性, 长度均为 156 bp。通常, G+C 量是反映亲缘关系的重要依据, 亲缘关系越亲近其 G+C 量相差越小^[17]。从表 2 中可发现, 14 种山药种质 ITS1 区 G+C 量为 43.0%~51.9%, ITS2 区 G+C 量为 47.3%~59.9%, 可见 ITS1 及 ITS2 区 G+C 量均有明显差异, 暗示各山药种质遗传差异较大。

3.3 ITS 序列差异及遗传距离

遗传距离显示, 铁棍山药、太谷山药、花籽山药、白玉山药、水晶山药、清源山药、海南山药之间遗传距离为 0, 紫参薯与它们之间遗传距离最大, 为 0.517 2, 提示紫参薯与这些山药种质遗传关系疏远; 广西山药与乐南山药遗传距离较小, 为 0.012 7, 表明两者亲缘关系十分相近 (表 3)。

14 种山药种质 ITS 序列存在丰富的碱基变异, 当空位始终作缺失处理时, 对位排列后 ITS1 共有 102 个变异位点, 其中 90 个简约信息位点, 12 个单一变异位点 (图 2); ITS2 也存在 102 个变异位点, 其中 86 个简约信息位点, 16 个单一变异位点 (图 3)。铁棍山药、太谷山药、花籽山药、白玉山药、水晶山药、清源山药及海南山药的 ITS 序列完全一致, 不存在任何碱基转化或颠换。14 种山药种质 ITS 序列转换/颠换比率为 5.347, 以碱基转化置换的形式为多, 尤其以 T $\rightarrow$ C 碱基转化率为高, 转化率达到 39.95%, 这与 T、C 碱基的结构易发生错配有关。一般亲缘关系接近的物种具有更高的转换差异比例, 这种差异在亲缘关系接近

表 2 14 种山药种质 ITS 序列长度及碱基频率分布

Table 2 Length and base frequency in ITS sequences from 14 germplasms of *Dioscoreae Rhizoma*

种质	ITS1		ITS2		全长 ITS	
	长度 / bp	(G+C) / %	长度 / bp	(G+C) / %	长度 / bp	(G+C) / %
TIE	165	43.0	158	49.4	594	46.1
TGS	165	43.0	158	49.4	594	46.1
HZS	165	43.0	158	49.4	594	46.1
BYS	165	43.0	158	49.4	594	46.1
QYS	165	43.0	158	49.4	594	46.1
SJS	165	43.0	158	49.4	594	46.1
HNS	165	43.0	158	49.4	594	46.1
CTS	156	51.9	149	56.4	575	51.1
LNS	141	43.2	146	47.2	558	45.9
NPS	156	52.0	149	55.7	575	51.0
BSY	153	51.7	154	51.3	577	48.7
ZSY	151	47.7	151	60.3	574	51.6
GDS	148	50.0	151	54.3	569	49.6
GXS	141	44.7	155	48.4	567	46.5
平均	157	45.8	154	51.3	582	47.7

表 3 14 种山药种质 ITS (ITS1+ITS2) 序列的 K2-P 模型遗传距离

Table 3 K2-P model genetic distances of ITS (ITS1 + ITS2) sequences among 14 germplasms from *Dioscoreae Rhizoma*

种质	TIE	TGS	HZS	BYS	QYS	SJS	HNS	CTS	LNS	NPS	BSY	ZSY	GDS
TIE													
TGS	0												
HZS	0	0											
BYS	0	0	0										
QYS	0	0	0	0									
SJS	0	0	0	0	0								
HNS	0	0	0	0	0	0							
CTS	0.406 9	0.406 9	0.406 9	0.406 9	0.406 9	0.406 9	0.406 9						
LNS	0.182 8	0.182 8	0.182 8	0.182 8	0.182 8	0.182 8	0.182 8	0.442 7					
NPS	0.406 9	0.406 9	0.406 9	0.406 9	0.406 9	0.406 9	0.406 9	0.002 5	0.442 7				
BSY	0.465 3	0.465 3	0.465 3	0.465 3	0.465 3	0.465 3	0.465 3	0.418 8	0.464 1	0.414 3			
ZSY	0.517 2	0.517 2	0.517 2	0.517 2	0.517 2	0.517 2	0.517 2	0.460 8	0.515 6	0.465 6	0.304 4		
GDS	0.468 2	0.468 2	0.468 2	0.468 2	0.468 2	0.468 2	0.468 2	0.373 4	0.433 7	0.377 7	0.257 9	0.283 9	
GXS	0.179 7	0.179 7	0.179 7	0.179 7	0.179 7	0.179 7	0.179 7	0.433 4	0.012 7	0.433 4	0.459 6	0.505 4	0.428 8

转换/颠换 $R = 5.347$ transition/transversion $R = 5.347$

的类群中更为显著。广西山药与乐南山药亲缘关系近, 转换/颠换比率为 2.021, 而亲缘关系疏远的紫参薯和铁棍山药转换/颠换比率则为 0.874, 表明碱基变异中以颠换多于转换。

3.4 ITS 序列的山药资源系统发育树的构建

根据 14 种山药种质测序结果, 外加 NCBI 的日本薯蓣 (JAP) 序列 (FJ860085), 将 ITS1、5.8 S、ITS2 序列区作为一个共同数据矩阵运算, 以粉背薯

TIE CACAAATATG AAGGCTCGT TGCTATTATT CACCCTGTCT TACTTCTGTT TCCTTGGTGG GTGCCCCCA CAGGACAAAA ACCTTTTGTG TGCAATCAGC TCAGTAACAA ATTAAATA C [121]
TGS [121]
HZS [121]
BYS [121]
QYS [121]
SJS [121]
HNS [121]
CTS .. AGTGGTCT .. CCAG. TC. .. T. CCG. C. . TGTTCG. . C GGGGCGCCCC. G. . . C. G. C . GG. . T. GG GT. . . . CT. . A. . C. . . CG. AACT. TGA. . . T. AGTA. . C. A [121]
LNS . CT. G. GT. . T. . . T. T. C CTC. T. . . . A. C. TC. C. G AT. C. . . C. . . A. T. A. . A. . C. . . G. . . [121]
NPS .. AGTGGTCT .. CCAG. TC. .. T. CCG. C. . TGTTCG. . C GGGGCGCCCC. G. . . C. G. C . GG. . T. GG GT. . . . CT. . A. . C. . . CG. AACT. TGA. . . T. AGTA. . C. A [121]
BSY .. G. GTATCC .. CT. . AT. . CT. . G. . GCC TCGG. GAAGC . . CCGGACC . . GCGCCCC. . GG. . . . G GC. A. . C. GT. C . T. GT. G. TA . . T. AGTGTG T. ATT. G. C. A [121]
ZSY .. G. . C. T. T TGCAT. CT. C . CT. G. . GC. TCGG. G. GTC . G. C. . . GG GGAGGC. CCC AAG. . . . G G. . . TTTT. . A. . C. . . C . TAGTGGT. T . . T. AGCA. . CCA. . . . C. A [121]
GDS . CG. GT. TAC . . CT. . CT. C CTA. G. . GCC TCGG. G. ATC AG. CCGCCCC . GTAAAC. . AG. . . . C G. . . . CCT. . A. . C. GT. . . TAGTGG. . T . . T. AGTA. . CA. . . . C. A [121]
GXS . CT. G. GT. . T. . . T. T. C CTC. T. . . . A. C. TC. C. G AT. C. T. A. . A. . C. . . G. . . [121]

图2 14种山药种质 ITS1 序列的比对结果

Fig. 2 Comparison on ITS1 sequences from 14 germplasms of *Dioscoreae Rhizoma*

TIE TGTACCTCA AGCTTTGCTT GGTGTGGG GTGTCTCTGA GACTCCCTTA AAGTATTGGC AGCCGCCCTA GGTTCGGG CAGCACAAGT CGCACTCTCT ATCAGCAAAG GTAGCACCAT TAGCCTTTT TTCA [134]
TGS [134]
HZS [134]
BYS [134]
QYS [134]
SJS [134]
HNS [134]
CTS . CAC. A. C. C. . . . A. AA. CGGTCCG CGTG. . TCA. . TCG. CC. . . T. GGTCTTCT . CCCC. T. . . TT. TGG. . AC TT. G. . AAAG GGTGTTCGG. AGTA. G. . G. A. A. . CA. . . C. A. [134]
LNS T. C. T CT. C. AC. G. T. TC. G. GC . CTCAT. . C. . ACGA. . . . A. A. . TACA. . . . AC [134]
NPS . CAC. A. C. C. . . . A. AA. CGGTCCG CGTG. . TCA. . TCG. CC. . . T. GGTCTTCT . TCCC. T. . . TT. TGG. . AC TT. G. . AAAG GGTGTTCGG. AGTA. G. . G. A. A. . CA. . . C. A. [134]
BSY . CA. . . CT. . . . ACA. . . . AT. A C. ACGG. CG T. G. T. . CC. . . A. G. AGT. G. AG . TCC. T. . . T. T. ATT. . T. G. . T. TG T. AG. . GCT. CCCC. G. . G. A. A. . AA. . . . TC [134]
ZSY . CA. . . . G. G. . CCGT. CC . . C. . . . G C. . . . GATCT. CGGA. . CG. . . A. G. . . . G. AGCCG. CT . C. C. . A. . . T. T. ATT. . T. G. . GGGG GG. GA. . GC. . . CTG. . G. . A. . A. . C . A. [134]
GDS . CA. CA. A C. . CCGTACG CGT. . CA. . TCG. G. T. ACGTCG . C. . C. A. . . T. T. ATCA. . T. GT. ACTG G. A. T. GTC. CGGA. G. . G. . A. . AAC. . C. G. [134]
GXS T. C. T GT. C. AC. G. T. TC. G. GC . CTCAT. . C. . ACGA. G. . A. A. . TACA. . . . AC [134]

图3 14种山药种质 ITS2 序列的比对结果

Fig. 3 Comparison on ITS2 sequences from 14 germplasms of *Dioscoreae Rhizoma*

蕹为外类群，gap 作缺失状态分析，MEGA 对位排列后 ITS 长度为 571 位点，其中可变位点 361 个，系统发育信息位点 255 个，分别占序列长度的 63.2% 和 44.6%。邻接法和最大简约法构建的系统树在拓扑结构上基本一致，仅在自展支持率上略有差异。系统树（图 4）表明，15 个种质（包含日本薯蕹）可聚为 2 个支系。其中，分支 I（Clade I）中包含山薯和参薯 2 个物种，紫参薯与广东山药在 52% 以上支持率下先聚成小分支，白圆参薯与该分支组成姊妹群，两者支持率在 98% 以上。分支 II（Clade II）中则包含日本薯蕹、薯蕹和褐苞薯蕹 3 个基原山药；薯蕹种下亲缘关系十分相近，铁棍山药、太谷山药、花籽山药、水晶山药、清源山药、白玉山药、海南

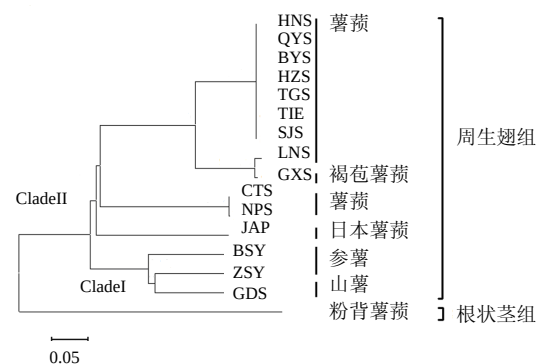


图4 邻接法、最大简约法构建的山药资源系统发育树
Fig. 4 Phylogenetic trees of *Dioscoreae Rhizoma* resource constructed using NJ and MP methods

山药等7个种质,以及长竹小薯、南平山药2个种质均在99%以上支持率下相聚。值得注意的是,薯蓣种下的乐南山药与褐苞薯蓣紧密相聚,两者相聚得到94%以上的支持。日本薯蓣位于分支II的基部,在51%以上支持率下与薯蓣、褐苞薯蓣构成的支系相聚。

4 讨论

4.1 基于 ITS 序列的山药资源系统进化分析

在薯蓣属中,已有研究从叶片气孔、维管束、花粉类型、淀粉粒形态、染色体数目等方面解析薯蓣属原始演化过程,认为根状茎组是最原始的组,而周生翅组则是最进化的自然类群^[18]。但位于周生翅组中的山药其进化关系如何尚无定论。本实验基于 ITS 序列分析表明,参薯与山薯关系亲密,严格聚合在一起(Clade II),在系统位置上位于发育树基部。参薯在我国野生种未见分布,被推断认为是由亲缘野生种 *D. hamiltonii* 和褐苞薯蓣杂交而来^[7],而本实验 ITS 表明,进化关系上参薯要先于褐苞薯蓣,并不支持这种推断。其次,薯蓣、褐苞薯蓣、日本薯蓣关系亲密,组成单一支系(Clade I)。原产我国的薯蓣,有学者推断是由日本薯蓣演化而来^[6]。在支系 I 中日本薯蓣位置孤立位于支系基部,相比薯蓣的进化更为原始,ITS 进化支持这种推断。山药类群具有膨大的地下块茎,多为1年生,染色体 $X=10$,均为多倍体等共同特征,而块茎类的原始类型很可能是从二倍体根茎组祖先分化而来^[2]。先前,本课题组曾利用 *rbcL* 序列研究认为山药是单系群,起源于共同的祖先^[19]。本实验以根状茎组的粉背薯蓣($2n=40$)作外类群置根分析表明,各山药种质遗传差异均基于单系群间的变化,进一步支持块茎类山药属单系群观点,共同的祖先很可能是由二倍体根茎组演化而来。

4.2 褐苞薯蓣与薯蓣亲缘关系探讨

经典分类学上,褐苞薯蓣与薯蓣主要分类依据是薯蓣叶缘常3裂、叶形变异大,褐苞薯蓣茎常4~8条棱,叶表面网脉明显,在形态上两者差异较大。但方玉霖等^[20]通过叶脉特征观察,阐明两者均为弧形脉;杭悦宇等^[21]从淀粉形态上获悉两者均为单粒,且脐点、层纹清晰;秦慧贞等^[2]也从染色体上证实两者均为多倍体;郑玉红^[22]综合气孔类型、叶脉特征、淀粉粒形态、染色体数目等45个广义形态学性状,揭示薯蓣和褐苞薯蓣单独聚为一类,关系亲密。可见,在微观形态学上两者亲缘关系相

近。《广西中药材标准》把广西山药基原植物记载为褐苞薯蓣^[23]。据考证,广西山药从清乾隆年间由野生引为家种^[24],当时野生种很可能为薯蓣,经过悠久栽培形态发生了变异,并进一步演化成薯蓣的一种变异类型,订为褐苞薯蓣。刘玉萍等^[9]曾通过18S rRNA 测序研究表明,薯蓣与褐苞薯蓣同源性达到了100%,遗传距离为0,并推测褐苞薯蓣是薯蓣种的种内变异类型。本实验 ITS 的研究显示,褐苞薯蓣与薯蓣种内的乐南山药紧密聚合一起,得到94%以上自展率支持,两者遗传距离仅为0.0127,进一步证实褐苞薯蓣和薯蓣具有十分相近的亲缘关系,支持刘玉萍的观点。

4.3 ITS 序列差异在多基原山药鉴别中的意义

我国商品山药主要来源于薯蓣、参薯、褐苞薯蓣、山薯等4种植物,其中薯蓣为《中国药典》2010年版收载品种,其它在南方各省作为地方习用山药药材^[5,25]。此外,日本薯蓣在日本也作为药材使用,我国安徽、江苏、浙江等地常有分布,但在我国并未进入商品药材使用阶段。山药栽培变异大、来源众多,且常受环境、栽培措施影响,仅从形态学鉴别各基原药材较难。DNA 作为植物遗传信息载体,从基因水平鉴别多基原药材更具优势。本实验中,14种山药种质存在丰富的碱基差异,ITS1、ITS2区均具有102个碱基差异,可为山药准确鉴定提供可靠的依据。此外,环境变迁也可能导致基因型的变化,如河南产区的6个薯蓣种质无碱基变化,而在福建产区4个薯蓣种质却存在碱基变异,两个产区之间碱基差异明显,这种环境与碱基差异的关系在鉴别地道药材中可发挥积极的作用。

参考文献

- [1] Ucko P J, Dimbleby G H. *The Domestication and Exploitation of Plants and Animals* [M]. London: Duckworth Publishers, 1969.
- [2] 秦慧贞, 张美珍, 凌苹苹, 等. 中国薯蓣属细胞分类的研究-染色体数与该属起源和演化 [J]. 植物分类学报, 1985, 23(1): 11-18.
- [3] 龚月娟, 李健强, 靳乐山, 等. 中国历代种子保健沿革 [J]. 中国农业科学, 2003, 36(4): 448-457.
- [4] 杭悦宇. 山药本草考证 [J]. 中草药, 1989, 20(5): 36-38.
- [5] 徐国钧, 徐珞珊. 常用中药材品种整理和质量研究 (南方篇 第2册) [M]. 福州: 福建科学技术出版社, 1997.
- [6] 巩庆平, 程 广, 袁良敏. 山药标准化栽培技术 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2004.

- [7] Nemorin A, David J, Maledon E, *et al.* Microsatellite and flow cytometry analysis to help understand the origin of *Dioscorea alata* polyploids [J]. *Ann Bot*, 2013, 112(5): 811-819.
- [8] 秦慧贞, 杭悦宇. 广东淮山的调查报告 [J]. 中国中药杂志, 1992, 17(1): 8-9.
- [9] 刘王萍, 何报作, 曹 晖. 基因测序技术在中药质量研究中的应用 (II)——山药基原的 DNA 测序鉴别 [J]. 中草药, 2001, 32(11): 1026-1030.
- [10] 王建波, 张文驹, 陈家宽. 核 rDNA 的 ITS 序列在被子植物系统与进化研究中的应用 [J]. 植物分类学报, 1999, 37(4): 407-416.
- [11] 易 骏, 廖芳平, 郑伟文. 不同种质来源孩儿参的 rDNA ITS 区序列分析及鉴别 [J]. 中草药, 2013, 44(10): 1318-1322.
- [12] 蒋 明, 李嵘嵘, 管 铭, 等. 悬钩子属植物 rDNA ITS 序列的克隆与分析 [J]. 中草药, 2013, 44(15): 2143-2149.
- [13] 徐光明, 蔡进来, 陈明义. 台湾产薯蓣属植物亲缘关系之研究 [J]. 台湾生物多样性研究, 2010, 12(3): 291-301.
- [14] Gao X, Zhu Y P, Wu B C, *et al.* Phylogeny of *Dioscorea* sect. *Stenophora* based on chloroplast *matK*, *rbcL* and *trnL-F* sequences [J]. *J Syst Evol*, 2008, 46(3): 315-321.
- [15] Wu Z, Raven P H. *Flora of China* [M]. Beijing: Science Press, 2000.
- [16] 吴志刚, 李小侠, 范传颖, 等. 相关系列扩增多态性分子标记分析部分山药品种遗传多样性 [J]. 中国药学杂志, 2013, 23(9): 681-686.
- [17] Rodríguez-Trelles F, Tarrío R, Ayala F J. Evidence for a high ancestral GC content in *Drosophila* [J]. *Mol boil Evol*, 2000, 17: 1710-1717.
- [18] 李鹤鸣, 张晓蓉, 王菊凤. 我国薯蓣属植物基础研究进展 [J]. 经济林研究, 1999, 17(2): 43-46.
- [19] 吴志刚. 山药种质资源遗传亲缘关系及药材质量研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2012.
- [20] 方玉霖, 刘剑秋, 姜业芳. 福建薯蓣属植物叶脉序特征及其分类学意义 [J]. 福建师范大学学报: 自然科学版, 2002, 18(2): 65-69.
- [21] 杭悦宇, 徐璐珊, 史德荣, 等. 中国薯蓣属植物地下茎淀粉粒形态特征及其分类学意义 [J]. 植物资源与环境学报, 2006, 15(4): 1-8.
- [22] 郑玉红. 中国薯蓣属 (*Dioscorea* L.) 周生翅组 (Sect. *Enantiophyllum*) 的系统学研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2006.
- [23] 广西中药材标准 [S]. 1996.
- [24] 叶 强. 广西多来源药材及混杂品种的调查与考证 [M]. 南宁: 广西科学出版社, 1989.
- [25] 中国药典 [S]. 一部. 2010.