

栽培种甘薯及其近缘野生种 nrDNA ITS 序列分析

俞立璇^{1,2}, 刘美艳^{1,2}, 曹清河³, 余益成^{1,2}, 谢逸萍³,
罗永海^{1,2}, 韩永华^{1,2*}, 李宗芸^{1,2*}

(1. 江苏师范大学生命科学学院, 整合植物生物学研究所, 江苏徐州 221116; 2. 江苏师范大学, 江苏省药用植物生物技术重点实验室, 江苏徐州 221116; 3. 中国农业科学院甘薯研究所徐州甘薯研究中心, 江苏徐州 221121)

摘要: 采用核糖体 DNA 内转录间隔区 (nrDNA ITS) 序列比较分析了甘薯及其近缘野生种的遗传多样性及系统进化关系, 首次报道了栽培种甘薯‘徐薯 18’ (*Ipomoea batatas* ‘Xushu18’) 及其近缘野生种 *I. triloba* (DOM), *I. cordatotriloba* (MEX), *I. nil* (PER), *I. nil* (JPN), *I. hederacea* Jacq. (USA), *I. hederacea* Jacq. (HK) 和种间杂交种 67-1 (*I. batatas* ‘Xushu18’ × *I. hederacea* Jacq.) 及回交种 (67-1 × *I. batatas* ‘Xushu18’) 的 nrDNA ITS 序列。序列分析表明, 栽培种甘薯及其近缘野生种 nrDNA ITS 序列长度为 570~600 bp。其中, ITS1 序列为 185~209 bp, GC 含量为 53.11%~61.83%; ITS2 序列为 214~226 bp, GC 含量为 61.21%~72.89%; 5.8S 序列均为 165 bp, GC 含量为 54.55%~55.76%。此外, 栽培种甘薯及其近缘野生种 ITS 序列信息位点均集中在 ITS1 和 ITS2 区; 与其他甘薯属植物相比, *I. wrightii* ITS2 的末端缺失了 6~8 个碱基。系统进化分析表明, 栽培种甘薯‘徐薯 18’ (*I. batatas* ‘Xushu18’) 和野生种 *I. triloba*、*I. cordatotriloba*、*I. lacunosa*、*I. trifida* 的亲缘关系较近, 与 *I. wrightii*、*I. pes-tigridis*、*I. grandifolia*、*I. nil*、*I. hederacea* Jacq.、*I. purpurea* 的亲缘关系较远; 杂交后代与栽培种甘薯‘徐薯 18’ (*I. batatas* ‘Xushu18’) 亲缘关系较近, 与野生种父本 *I. hederacea* Jacq. 的亲缘关系较远。

关键词: 甘薯; nrDNA ITS; BLAST; 遗传距离; 系统发育树

中图分类号: S632

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2014)01-0040-10

Analysis of nrDNA ITS Sequences in *Ipomoea batatas* and its Relative Wild Species

YU Li-Xuan^{1,2}, LIU Mei-Yan^{1,2}, CAO Qing-He³, YU Yi-Cheng^{1,2}, XIE Yi-Ping³,
LUO Yong-Hai^{1,2}, HAN Yong-Hua^{1,2*}, LI Zong-Yun^{1,2*}

(1. Institute of Integrative Plant Biology, School of Life Sciences, Jiangsu Normal University, Xuzhou, Jiangsu 221116, China; 2. Jiangsu Normal University, Key Laboratory of Biotechnology for Medicinal Plants of Jiangsu Province, Xuzhou, Jiangsu 221116, China; 3. Xuzhou Sweet Potato Research Centre, Institute of Sweet Potato, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Xuzhou, Jiangsu 221121, China)

Abstract: In this study, the internal transcribed spacer of nucleus ribosome DNA (nrDNA ITS) copies from *Ipomoea batatas* and its wild relatives were cloned and sequenced to analyze their phylogenetic relationships. For the first time, we report on the nrDNA ITS sequences isolated from *I. batatas* ‘Xushu18’ and its relative wild species (*I. triloba* (DOM), *I. cordatotriloba* (MEX), *I. nil* (PER), *I. nil* (JPN), *I. hederacea* Jacq. (USA), *I. hederacea* Jacq. (HK)), an interspecific hybrid 67-1 (*I. batatas* ‘Xushu18’ × *I. hederacea* Jacq.), and a backcross

收稿日期: 2013-07-01, 修回日期: 2013-11-08。

基金项目: 江苏省高校自然科学研究重大项目(12KJA180001); 江苏省基础研究计划(自然科学基金)资助项目(BK2012579); 江苏省普通高校研究生科研创新计划项目(CXLX120987); 国家甘薯产业技术体系(CARS-11-B-09)。

作者简介: 俞立璇(1988-), 女, 硕士研究生, 主要从事植物遗传学研究(E-mail: 875881573@qq.com)。

* 通讯作者 (Author for correspondence): 李宗芸, 教授, 博士生导师, 主要从事植物遗传学研究 (E-mail: zongyunli@jnsu.edu.cn); 韩永华, 副教授, 硕士生导师, 主要从事植物遗传学研究 (E-mail: hanyonghua@jnsu.edu.cn)。

line (67-1 × *I. batatas* ‘Xushu18’). Analysis showed that the nrDNA ITS sequences ranged from 570 bp to 600 bp. Among them, the ITS1 fragments ranged from 185 bp to 209 bp, with GC content of 53.11%–61.83%; the ITS2 regions ranged from 214 bp to 226 bp, with GC content of 61.21%–72.89%; the 5.8S sequences were 165 bp, with GC content of 54.55%–55.76%. Furthermore, the informative sites of *I. batatas* and its wild relatives lay in the ITS1 and ITS2 regions; in contrast to other *Ipomoea* germplasms, there was a 6–8 bp deletion in the ITS2 of *I. wrightii*. Phylogenetic analysis revealed that *I. batatas* ‘Xushu18’ had closer phylogenetic relationships with the wild relatives of *I. triloba*, *I. cordatotriloba*, *I. lacunosa*, and *I. trifida* than *I. wrightii*, *I. pes-tigridis*, *I. grandifolia*, *I. nil*, *I. hederacea*, and *I. purpurea*. Moreover, the interspecific hybrid and the backcross line had closer phylogenetic relationships with *I. batatas* ‘Xushu18’, compared to *I. hederacea*.

Key words: *Ipomoea batatas*; nrDNA ITS; BLAST; Evolutionary divergence; Phylogenetic trees

甘薯 (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) 又称地瓜、红苕、番薯、红薯、山芋等, 是旋花科 (Convolvulaceae) 甘薯属植物, 在我国的栽培面积和总产仅次于水稻、小麦和玉米, 是一种重要的粮食、蔬菜、工业原料和新型能源作物, 具有防癌、抗氧化等保健功能^[1]。近年来, 甘薯作为一种健康食品越来越受到人们的青睐, 功能性新特优甘薯品种的选育已成为甘薯育种的主导方向。但是, 由于我国育成的甘薯品种近 94% 具有南瑞苕和胜利百号的血缘^[2], 导致甘薯育种背景狭窄, 制约了甘薯品种改良的进度和质量。‘徐薯 18’ (*Ipomoea batatas* ‘Xushu18’) 是中国农业科学院甘薯研究中心于 1976 年育成的优良品种, 为近亲杂交的回交后代 (来源于南瑞苕与胜利百号)。“徐薯 18”高抗根腐病, 较抗蔓割病, 但对黑斑病和茎线虫病抗性差^[3]; 抗逆性强, 耐旱、耐瘠、耐湿性较强, 不择土质, 适应性广, 春夏都能增产, 已在华北、华中、华东及西南的四川等地大面积种植, 年推广面积超过 $16 \times 10^5 \text{ hm}^2$, 是我国自育品种中推广面积最多的良种。甘薯近缘野生种种质资源非常丰富, 在世界上分布有 600~700 种^[4], 是抗病、抗虫、抗逆性基因的重要载体^[5], 但由于栽培种甘薯遗传背景复杂, 与其近缘野生种之间的亲缘关系也不够清晰等原因, 导致育种实践中甘薯野生种质资源的利用受到极大限制。

近年来, 研究者采用不同的分子标记 (AFLP、RFLP、SSR 和 RAPD 等), 并结合叶绿体 DNA 及

核糖体 DNA 内转录间隔区序列等对热带美洲、大洋洲、秘鲁、菲律宾、巴西及新几内亚等地甘薯栽培种及其近缘野生种遗传多样性进行了分析, 以期进一步了解甘薯与近缘野生种之间的亲缘关系, 并对栽培种甘薯的起源进化进行有益的探索^[6-10]。

核糖体 DNA 内转录间隔区 (internal transcribed spacer, ITS) 是介于 18S~26S 之间的非编码转录区, 在核基因组中是高度重复的, 中间的高保守区 5.8S 将 ITS 序列分为 ITS1 和 ITS2 两个区段。在被子植物中, nrDNA ITS 既具有核苷酸序列的高度变异性又有长度上的保守性, 说明这些间隔区的序列很容易在近缘类群间排序, 而且丰富的变异可在较低的分类阶元上 (如属间、种间, 甚至种内) 解决植物系统发育问题^[11], 因此被广泛用于系统发育及其亲缘关系的研究^[12-14]。Miller 等^[15]曾对旋花科甘薯属牵牛亚属的系统发育关系进行了分析, 结果表明, 基于 nrDNA ITS 序列与 cpDNA RFLP 标记的分析结果显示了高度的一致性。王晓锋等^[16]的研究也表明, ITS1 和 ITS2 含有丰富的变异位点和信息位点, 是探讨被子植物属下水平的系统分类与进化研究的重要分子标记。

本研究采用 PCR 技术扩增了甘薯及其 10 个近缘野生种的 nrDNA ITS 序列, 并进行克隆测序。首次报道了栽培种甘薯 ‘徐薯 18’ (*I. batatas* ‘Xushu18’)、甘薯近缘野生种 *I. triloba*、*I. cordatotriloba*、*I. nil*、*I. hederacea* Jacq. 等物种的 nrDNA ITS 序列; 分析了种间杂交种 67-1 (*I.*

batatas ‘Xushu18’ × *I. hederacea* Jacq.) 及回交种 (67-1 × *I. batatas* ‘Xushu18’) 的 nrDNA ITS 序列并与亲本进行了比较; 还结合 GenBank 中相关甘薯属植物的 nrDNA ITS 序列对甘薯属植物种间及种内的亲缘关系进行了分析, 为甘薯遗传育种提供基础遗传学理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

栽培种甘薯 ‘徐薯 18’ (*Ipomoea batatas* ‘Xushu18’) 及其近缘野生种材料由中国农业科学院甘薯研究中心提供。甘薯 ‘徐薯 18’ 的系谱见图 1, 种名、来源、类型及倍性等详见表 1。

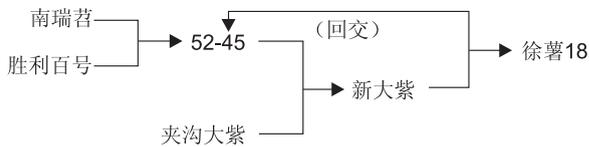


图 1 ‘徐薯 18’ 系谱图

Fig. 1 Family tree of *I. batatas* ‘Xushu18’

1.2 实验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取

采用 CTAB 法^[17] 提取甘薯基因组 DNA, 检测其浓度及纯度后, 置 4℃ 保存备用。

1.2.2 nrDNA ITS 序列的 PCR 扩增

采用双引物扩增法扩增样本基因组 nrDNA ITS

序列, 引物为通用引物 ITS4 (5′-TCCTCCGCTTATT-GATATGC-3′) 和 ITS5 (5′-GGAAGTAAAAGTCG-TAACAAGG-3′)。PCR 扩增是在 Master cycler 梯度 PCR 仪 (Eppendorf) 上进行, PCR 扩增体系为 50 μL, 包括 5 μL 10 × buffer、4 μL 200 μmol/L 的 dNTP 混合物、引物 P1 和 P2 各 1 μL (0.4 μmol/L)、1.5 μL 模板 (100 ng/μL)、1.25 μL Taq 酶、36.25 μL 双蒸水。反应程序为: 95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 复性 30 s, 28 个循环, 最后 72℃ 保温 10 min; 将 PCR 扩增产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 并置于凝胶成像系统 (BIO-RAD CelDoc EQ) 观察和拍照。

1.2.3 PCR 产物的克隆与测序

对 PCR 反应产物回收纯化后, 克隆到 PMD18-T 载体和连接酶构建的重组质粒 (16℃, 45 min) 中, 转入 JM109 感受态细胞, 冰浴 30 min, 37℃ 震荡培养 1 h, 涂平板 (Amp), 37℃ 过夜。取阳性克隆测序, 同时也进行 PCR 产物直接测序, 序列测定由上海生工生物工程技术有限公司 (<http://www.sangon.com/>) 完成。

1.2.4 序列分析及系统发育树构建

在 NCBI 数据库中 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 用 BLAST 进行同源检测, 以确认所测序列 ITS 区的正确性; 采用软件 BioEdit 对本实验

表 1 材料来源
Table 1 Origin of materials

类型 Type	分类群 Taxon	来源 Origin	倍性 (n=15) Ploidy
育成种 Cultivar	‘徐薯 18’ <i>I. batatas</i> ‘Xushu18’		6n
杂交种 Hybrid	67-1 (<i>I. batatas</i> ‘Xushu18’ × <i>I. hederacea</i> Jacq.)	中国农业科学院甘薯研究中心培育	90
回交种 Backcross	67-1 × <i>I. batatas</i> ‘Xushu18’		90
	槭叶小牵牛 <i>Ipomoea wrightii</i>	Dominican Rep.	2n
	虎掌藤 <i>I. pes-tigidis</i>	Queensland, Australia	2n
	管花薯 <i>I. grandifolia</i>	Lima, Peru	2n
	三裂叶薯 <i>I. triloba</i>	Dominican Rep.	2n
野生种 Wild species	<i>I. cordatotriloba</i>	United Mexican States	2n
	白星薯 <i>I. lacunosa</i>	United States of America	2n
	大花牵牛 <i>I. nil</i>	Lima, Peru	2n
	大花牵牛 <i>I. nil</i>	Japan	2n
	碗仔花 <i>I. hederacea</i>	Hong Kong, China	2n
	碗仔花 <i>I. hederacea</i>	United States of America	2n

通过测序成功获得的 13 份供试材料的 ITS 区序列, 以及从 GenBank 中获取的 13 份甘薯属植物 nrDNA ITS 序列(表 2)进行长度及 GC 含量分析;

表 2 从 GenBank 中获取的 13 份甘薯属植物 ITS 序列
Table 2 Thirteen species of *Ipomoea* and their accession numbers from GenBank

分类群 Taxon	GenBank 序列号 Accession number
<i>I. batatas</i> var. <i>apiculata</i>	DQ355319
<i>I. lacunosa</i>	DQ355324
<i>I. cordatotriloba</i>	AF110939
三浅裂野牵牛 <i>I. trifida</i>	DQ355320
番薯 <i>I. batatas</i>	HM014433
变色牵牛 <i>I. indica</i>	AY538295
<i>I. arachnosperma</i>	AF309158
白花牵牛 <i>I. plebeia</i>	AF110911
圆叶牵牛 <i>I. purpurea</i>	AF538316
五爪金龙 <i>I. cairica</i>	AY538278
<i>I. cairica</i>	HM014431
<i>I. nil</i>	AY538304
<i>I. triloba</i>	HM014434

用 Clustal X 软件进行多序列匹配排列, 并对个别位点做必要的人工校准后, 通过 DNAsp 5 软件对碱基变化进行分析; 最后通过 MEGA 5 软件中的邻接法(neighbor-joining)来获得系统发育树和遗传距离图, 并通过自展分析(bootstrap)做置信度检测, 自展数据集为 1000 次。

2 结果与分析

2.1 nrDNA ITS 序列扩增

以 CTAB 法提取的‘徐薯 18’(*Ipomoea bata*

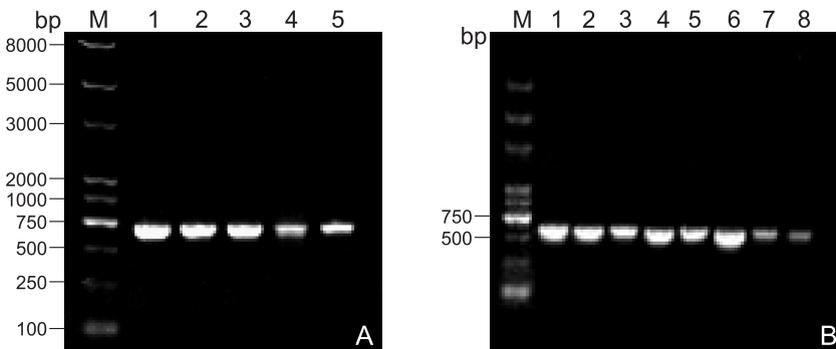
tas ‘Xushu18’) 及其近缘野生种的基因组 DNA 分别作为模板进行双引物(ITS4 和 ITS5)PCR 扩增。反应产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 扩增片段在 700 bp 处有明亮条带(图 2)。

2.2 nrDNA ITS 序列分析

对栽培种甘薯‘徐薯 18’(*I. batatas* ‘Xushu18’) 及其杂交种、回交种和近缘野生种共计 13 份样本的 nrDNA ITS 序列进行了分析, ITS 区序列长度在 570~600 bp 之间(表 3)。其中, ITS1 序列长度为 185~209 bp, GC 含量为 53.11%~61.83%; ITS2 序列长度为 214~226 bp, GC 含量为 61.21%~72.89%; 5.8S 序列长度为 165 bp, GC 含量为 54.55%~55.76%。采用软件 Clustal X 及 DNAsp 5 对 13 份样本及从 GenBank 中获取的 13 份近缘甘薯属植物进行了序列比对及碱基替换分析(空位 Gap 作缺失处理), 结果表明: ITS 区序列长度为 616 bp; ITS1 含有 100 个变异位点, 其中 74 个为信息位点, 分别占总位点数的 47.17% 和 34.91%; ITS2 序列中的变异位点为 96 个, 其中信息位点有 77 个, 分别占总位点数的 40.51% 和 32.49%; 5.8S 为保守序列区, 仅有 6 个变异位点, 其中 3 个为信息位点, 分别占总位点数的 3.64% 和 1.82%。

2.3 ITS 序列系统发育分析

以小牵牛属植物 *Jacquemontia mexicana* 为外类群, 采用软件 Clustal X 和 MEGA 5 对栽培种甘薯及其近缘野生种的 nrDNA ITS 序列及从 GenBank 中获取的 13 份甘薯属植物 nrDNA ITS 序列



A: 1. *I. batatas* ‘Xushu18’; 2. *I. hederacea* (HK); 3. *I. hederacea* (USA); 4. Hybrid 67-1; 5. Backcross. B: 1. *I. grandifolia*; 2. *I. triloba*; 3. *I. cordatotriloba*; 4. *I. lacunosa*; 5. *I. nil* (PER); 6. *I. nil* (JPN); 7. *I. wrightii*; 8. *I. pes-tigidis*.

图 2 nrDNA ITS 序列 PCR 扩增产物的电泳检测

Fig. 2 nrDNA ITS region profile on an agarose gel generated by PCR amplification

表 3 栽培种甘薯及其近缘野生种 nrDNA ITS 序列分析
Table 3 Analysis of nrDNA ITS sequences of *Ipomoea batatas* and its relative species

分类群 Taxon	ITS Size (bp)	ITS1		5.8S		ITS2		GenBank 序列号 Accession number
		Size (bp)	G+C (%)	Size (bp)	G+C (%)	Size (bp)	G+C (%)	
<i>I. batatas</i> 'Xushu18'	573	186	60.75	165	54.55	222	70.27	GQ249409
67-1 (<i>I. batatas</i> 'Xushu18' × <i>I. hederacea</i>)	571	186	60.22	165	55.15	220	70.00	JQ316197
67-1 × <i>I. batatas</i> 'Xushu18'	570	185	60.00	165	55.15	220	70.00	JQ340478
<i>I. hederacea</i> (HK)	576	186	61.83	165	54.55	225	72.89	HQ288850
<i>I. hederacea</i> (USA)	576	186	59.68	165	54.55	225	72.00	HQ288851
<i>I. grandifolia</i>	577	187	60.43	165	54.55	225	67.56	JX423793
<i>I. triloba</i> (DOM)	571	186	60.75	165	55.15	220	69.55	JX423794
<i>I. cordatotriloba</i>	571	186	61.29	165	55.15	220	70.00	JX423795
<i>I. lacunosa</i>	571	186	60.75	165	55.15	220	69.55	JX423796
<i>I. nil</i> (PER)	594	208	59.13	165	55.76	221	70.14	JX423797
<i>I. nil</i> (JPN)	578	187	60.96	165	54.55	226	72.12	JX423798
<i>I. pes-tigridis</i>	600	209	57.41	165	55.15	226	65.49	AF110912
<i>I. wrightii</i>	588	209	53.11	165	54.55	214	61.21	AF110916

进行比对, 计算其遗传距离(表 4)并构建系统发育树(图 3)。

甘薯属植物 nrDNA ITS 区序列比对结果显示, *I. lacunosa*(DQ355324)和 *I. lacunosa*(JX423796), *I. cairica*(AY538278)和 *I. cairica*(HM014431)的 ITS 序列完全一致。

从甘薯属植物间的遗传距离(表 4)可以看出, 与栽培种甘薯‘徐薯 18’(*I. batatas* ‘Xushu18’)遗传距离较近(0.002~0.012)的有 *I. batatas*、*I. batatas* var. *apiculata*、种间杂交种 67-1、回交种(67-1×*I. batatas* ‘Xushu18’)、*I. triloba*(DOM)、*I. cordatotriloba*(MEX)、*I. lacunosa*、*I. cordatotriloba*、*I. trifida*和 *I. triloba*; 遗传距离为 0.079 的有 *I. cairica*和 *I. nil*(PER); 在 0.100~0.104 之间的有 *I. nil*、*I. nil*(JPN)、*I. indica*和 *I. pes-tigridis*; 大于 0.110 的有 *I. hederacea*(HK)、*I. hederacea*(USA)、*I. plebeia*、*I. arachnosperma*、*I. purpurea*、*I. grandifolia*和 *I. wrightii*。其中, *I. purpurea*和 *I. grandifolia*以及 *I. nil*(PER)和 *I. cairica*之间的遗传距离接近于零。

根据甘薯属植物 nrDNA ITS 序列, 采用 N-J 法构建的系统发育树如图 3 所示。在系统发育树标尺约 0.03 处, 26 个甘薯属植物分别聚为 5 支(I, II, III, IV 和 V)。其中, 分支 I 由‘徐薯 18’(*I. batatas* ‘Xushu18’)、种间杂交种 67-1、*I. bata-*

tas、回交种(67-1 × *I. batatas* ‘Xushu18’)、*I. batatas* var. *apiculata*、*I. lacunosa*、*I. lacunosa*(USA)、*I. triloba*(DOM)、*I. cordatotriloba*、*I. cordatotriloba*(MEX)、*I. trifida*和 *I. triloba* 构成; 分支 II 由 *I. cairica*(AY538278)、*I. cairica*(HM014431)和 *I. nil*(PER)构成; 分支 III 为 *I. wrightii*; 分支 IV 由 *I. plebeia*、*I. arachnosperma*和 *I. pes-tigridis*构成; 分支 V 由 *I. purpurea*、*I. grandifolia*、*I. nil*、*I. nil*(JPN)、*I. hederacea*(HK)、*I. hederacea*(USA)和 *I. indica*构成。

3 讨论

3.1 nrDNA ITS 序列在甘薯属植物系统发育学研究中的价值

核糖体 DNA 的 ITS1 和 ITS2 区为非编码序列, 进化速度快于编码区序列, 在物种亲缘关系不同时, nrDNA ITS 序列常有位点和长度上的变异, 被广泛用于种间亲缘关系的分析^[19-21], 并由此讨论大尺度的进化问题。如宋葆华等^[22]采用 nrDNA ITS 序列成功地分析了中国菟属种间的系统发育关系, 周阿涛等^[23]也证明 ITS 序列在云南山茶种间存在多态性。而有关 nrDNA ITS 序列在种内材料间关系的探讨中, 不同物种的研究结果不尽相同。如董洋龙等^[24]对 11 个茶花品种遗传多样性的分析表明: nrDNA ITS 序列可以鉴定出不同茶

表 4 栽培种甘薯及其近缘野生种 nrDNA ITS 序列间的遗传距离
Table 4 Genetic distance among *Pomoea batatas* and its relative wild species

分类群 Taxon	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
1. <i>I. hederecea</i> (USA) HQ288851		0.005	0.006	0.006	0.010	0.010	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.017	0.017	0.017	0.020	0.014	0.014	0.022
2. <i>I. indica</i> AY538295	0.012		0.003	0.003	0.004	0.009	0.009	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.016	0.015	0.020	0.013	0.013	0.021	0.020
3. <i>I. nil</i> AY538304	0.016	0.004		0.002	0.005	0.009	0.009	0.014	0.014	0.014	0.015	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.015	0.015	0.015	0.019	0.013	0.013	0.020	0.020
4. <i>I. nil</i> (JPN) JX423798	0.018	0.006	0.002		0.005	0.009	0.009	0.015	0.015	0.015	0.014	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.019	0.013	0.013	0.020	0.020
5. <i>I. hederecea</i> (HK) HQ288850	0.023	0.010	0.014	0.016		0.010	0.010	0.016	0.016	0.016	0.016	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.016	0.016	0.020	0.014	0.014	0.021	0.021
6. <i>I. purpurea</i> AY538316	0.050	0.042	0.042	0.044	0.052		0.000	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.018	0.015	0.015	0.022	0.022
7. <i>I. grandifolia</i> JX423793	0.050	0.042	0.042	0.044	0.052	0.000		0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.018	0.015	0.015	0.022	0.022	0.022
8. *Xushu18' GQ249409	0.119	0.104	0.100	0.102	0.111	0.131	0.131		0.003	0.003	0.003	0.002	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.003	0.005	0.005	0.005	0.015	0.019	0.012	0.012	0.020	0.020
9. 67-1 JQ316197	0.119	0.104	0.100	0.102	0.111	0.131	0.131	0.004		0.003	0.003	0.002	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.003	0.005	0.005	0.005	0.015	0.019	0.013	0.013	0.020	0.020
10. <i>I. batatas</i> var. <i>apiculata</i> DQ355319	0.119	0.104	0.100	0.102	0.111	0.131	0.131	0.004	0.004		0.002	0.002	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.003	0.005	0.005	0.005	0.015	0.018	0.013	0.013	0.020	0.020
11. (67-1x 'Xushu18') JQ340478	0.121	0.107	0.102	0.104	0.114	0.133	0.133	0.006	0.006	0.002		0.003	0.005	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.005	0.004	0.005	0.015	0.018	0.013	0.013	0.020	0.020
12. <i>I. batatas</i> HMO14433	0.116	0.102	0.097	0.100	0.109	0.128	0.128	0.002	0.002	0.004	0.004		0.004	0.004	0.003	0.003	0.003	0.004	0.003	0.004	0.004	0.015	0.018	0.012	0.012	0.020	0.020
13. <i>I. condatrifolia</i> AF110839	0.119	0.105	0.100	0.102	0.111	0.131	0.131	0.010	0.010	0.012	0.008	0.002		0.002	0.003	0.003	0.003	0.004	0.003	0.004	0.004	0.015	0.018	0.013	0.013	0.020	0.020
14. <i>I. condatrifolia</i> (MEX) JX423795	0.117	0.102	0.097	0.100	0.109	0.128	0.128	0.008	0.008	0.010	0.006	0.002	0.003		0.003	0.003	0.003	0.002	0.004	0.005	0.014	0.015	0.018	0.013	0.013	0.020	0.020
15. <i>I. lacunosa</i> DQ355324	0.116	0.102	0.097	0.100	0.109	0.128	0.128	0.008	0.008	0.010	0.006	0.006	0.004	0.004		0.000	0.003	0.002	0.004	0.005	0.014	0.015	0.018	0.012	0.012	0.020	0.020
16. <i>I. lacunosa</i> (USA) JX423796	0.116	0.102	0.097	0.100	0.109	0.128	0.128	0.008	0.008	0.010	0.006	0.006	0.004	0.004	0.000		0.003	0.002	0.004	0.005	0.014	0.015	0.018	0.012	0.012	0.020	0.020
17. <i>I. trifida</i> DQ355320	0.117	0.102	0.098	0.100	0.109	0.128	0.128	0.008	0.008	0.010	0.012	0.008	0.008	0.006	0.006	0.006		0.003	0.004	0.004	0.014	0.014	0.018	0.013	0.013	0.019	0.019
18. <i>I. triloba</i> (DOM) JX423794	0.117	0.102	0.097	0.100	0.109	0.128	0.128	0.006	0.006	0.008	0.004	0.004	0.002	0.002	0.004	0.004	0.004		0.003	0.005	0.014	0.015	0.018	0.013	0.013	0.020	0.020
19. <i>I. triloba</i> HMO14434	0.114	0.100	0.100	0.102	0.107	0.131	0.131	0.012	0.012	0.014	0.010	0.010	0.008	0.008	0.008	0.010	0.006	0.006		0.015	0.015	0.018	0.013	0.013	0.013	0.019	0.019
20. <i>I. arachnosperma</i> AF309158	0.126	0.114	0.109	0.107	0.119	0.133	0.133	0.114	0.114	0.114	0.116	0.111	0.114	0.111	0.109	0.109	0.104	0.109	0.114		0.007	0.009	0.017	0.014	0.014	0.020	0.020
21. <i>I. pes-tigris</i> AF110912	0.128	0.116	0.111	0.109	0.121	0.138	0.138	0.104	0.104	0.104	0.107	0.102	0.104	0.102	0.100	0.100	0.095	0.100	0.104	0.023		0.010	0.016	0.015	0.015	0.020	0.020
22. <i>I. plebeia</i> AF110911	0.121	0.109	0.104	0.102	0.114	0.123	0.123	0.116	0.116	0.116	0.119	0.114	0.114	0.111	0.111	0.111	0.107	0.111	0.111	0.048	0.046		0.016	0.014	0.014	0.021	0.021
23. <i>I. wrightii</i> AF110916	0.165	0.160	0.155	0.157	0.165	0.148	0.148	0.146	0.146	0.141	0.139	0.144	0.141	0.139	0.139	0.139	0.134	0.139	0.146	0.131	0.129	0.121		0.016	0.016	0.024	0.024
24. <i>I. callica</i> AY538278	0.090	0.086	0.081	0.084	0.097	0.111	0.111	0.079	0.079	0.081	0.077	0.079	0.077	0.077	0.077	0.077	0.077	0.077	0.077	0.084	0.102	0.100	0.112	0.000	0.000	0.020	0.020
25. <i>I. callica</i> HMO14431	0.090	0.086	0.081	0.084	0.097	0.111	0.111	0.079	0.079	0.081	0.077	0.079	0.077	0.077	0.077	0.077	0.077	0.077	0.077	0.084	0.102	0.100	0.112	0.000	0.000	0.020	0.020
26. <i>I. nil</i> (PER) JX423797	0.090	0.086	0.081	0.084	0.097	0.111	0.111	0.079	0.079	0.081	0.077	0.079	0.077	0.077	0.077	0.077	0.077	0.077	0.077	0.084	0.102	0.100	0.112	0.000	0.000	0.020	0.020
27. <i>I. mexicana</i> AY560319	0.195	0.179	0.179	0.181	0.181	0.200	0.200	0.188	0.188	0.183	0.186	0.186	0.186	0.183	0.183	0.183	0.178	0.183	0.178	0.181	0.184	0.231	0.183	0.183	0.183	0.183	0.183

注：左下表示样品两两之间的遗传距离；右上表示样品两两之间的估计标准差。
Notes: Genetic distance data are shown between the diagonal; Standard error estimate(s) are shown above the diagonal.

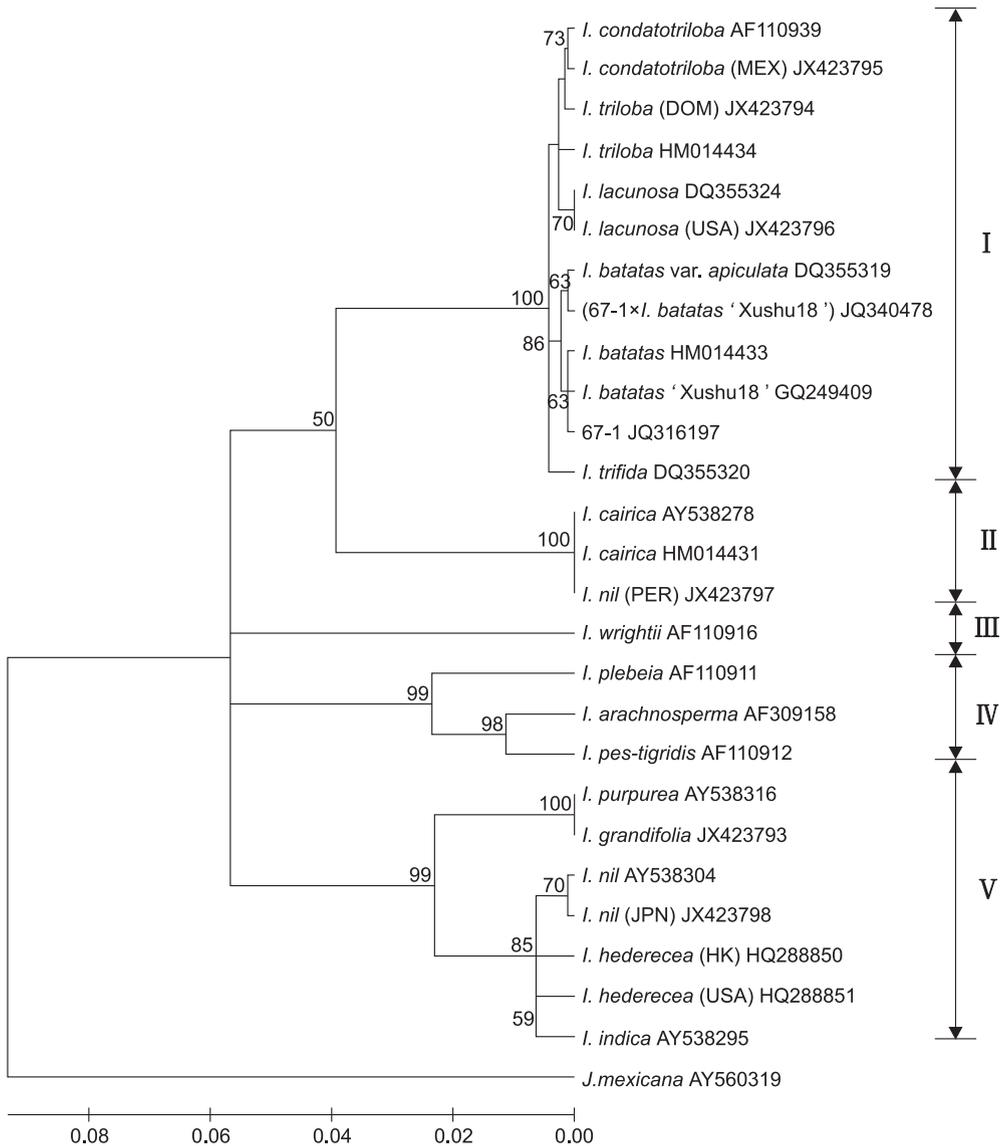


图 3 栽培种甘薯及其近缘野生种 ITS 序列的 N-J 系统发育树

Fig. 3 Neighbor-joining tree of *Ipomoea batatas* and its relative wild species based on ITS sequences

花品种间的亲缘关系，雷天刚等^[25]也通过 ITS 序列分析成功鉴定出了 18 个甜橙品种；但董若铖等^[26]对四川特色桑树 nrDNA ITS 序列的分析却发现 7 个品种间无差异。

本文对甘薯属植物 nrDNA ITS 序列的分析发现，ITS 序列的差异不仅在栽培种甘薯及其近缘野生种之间存在，而且在同种不同地理分布的材料间也存在一定的差异性，如 *I. batatas*、*I. condatotriloba*、*I. nil* 和 *I. hederecea*，此结果说明甘薯属植物的 nrDNA ITS 序列在探讨属下种间系统发育及种内材料间的亲缘关系等方面具有一定的参考价

值。对于甘薯属植物来讲，nrDNA ITS 序列不仅适用于较高分类等级的系统发育研究，也能反映种内材料间的变异及多态性。

3. 2 栽培种甘薯及其近缘野生种的系统发育关系

栽培种甘薯‘徐薯 18’(*I. batatas* ‘Xushu18’) 与 *I. batatas* var. *apiculata*，还有来源于美国、中国香港的 *I. hederecea* Jacq. 之间 nrDNA ITS 序列虽然存在一定的差异，但是较之与其近缘野生种不同种之间的序列差异相对较小，系统发育关系较近(图 3：分支 I 和 V)，这说明相对于种间材料来讲，甘薯属植物种内不同材料间的 nrDNA ITS 序

列仍然具有一定的保守性。但是,分别引自秘鲁和日本的 *I. nil*, 其遗传距离却相对较远(0.081)(表 4), 并且聚在了不同的分支中(图 3: 分支 II 和 V), 我们推测可能是不同生存环境对 *I. nil* 造成了不同方向的进化, 或是甘薯属植物之间本身存在着不同的分化类型。这种情况在其他物种的研究中也有报道, 如欧立军等^[27]通过对不同地区天门冬 nrDNA ITS 序列的分析表明, 相同地区的样品间 nrDNA ITS 序列基本相同, 而不同地区天门冬样品间 ITS 序列存在一定的差异; 刘磊等^[28]也证明, 不同产地松茸 nrDNA ITS 序列在进化过程中存在差异。由此可以推测, 不同种植物对环境改变的耐受力不同, 其表现的 nrDNA ITS 序列变化程度也不一致。

在进行遗传距离分析中发现, 有些样本间遗传距离接近于 0(表 4)。如 *I. lacunosa* (USA, JX423796) 和 *I. lacunosa* (DQ355324), *I. cairica* (AY538278) 和 *I. cairica* (HM014431) 为不同产地的同一物种, 其 ITS 序列未发生变异; *I. purpurea* 和 *I. grandifolia*, *I. nil* (PER) 和 *I. cairica* 为不同物种, 但其 ITS 序列间仅有 2~3 个碱基差异, 说明通过 nrDNA ITS 序列分析可以为甘薯属植物的物种进化提供一定的理论依据。

通过 ITS 序列比对分析发现, *I. wrightii* ITS2 的末端缺失了 6~8 个碱基, 这可能是 *I. wrightii* 与甘薯属植物其它物种间显示较远亲缘关系并在系统发育树中独自成支(图 3: 分支 III)的原因。此外, 在甘薯的近缘野生种中, *I. hederacea*、*I. purpurea* 与栽培种甘薯之间遗传距离较大, 亲缘关系较远, 并且具有抗病虫害、抗逆性强等优良性状, 可作为杂交育种亲本以扩大育种选择范围。中国农业科学院徐州甘薯研究所已利用栽培种甘薯‘徐薯 18’(*I. batatas* ‘Xushu18’)的近缘野生种 *I. hederacea* 和 *I. purpurea* 配置杂交组合, 并通过人工杂交及回交获得了杂交种和回交种^[29], 对甘薯及其野生种之间的种质利用与创新进行了有益的探索。

3.3 杂交和回交后代与亲本之间的亲缘关系

曹清河等^[29]对 10 个不同组合(不同抗性野生种 × *I. batatas* ‘Xushu18’)获得的有效杂交后代

进行了形态学、抗性及 SSR 标记等综合评价, 发现杂交后代均不同程度地继承了野生种父本的抗性。虽然杂交种的薯型欠佳, 但与其野生亲本的纤维根相比已有了很大的改进, 并且重要的是, 杂交后代有望遗传野生亲本优良抗性, 为下一步继续回交转育这些抗性基因提供了中间载体。

本研究通过对杂交亲本(*I. hederacea* Jacq. 和 *I. batatas* ‘Xushu18’)及其杂交种 67-1(*I. batatas* ‘Xushu18’ × *I. hederacea* Jacq.)、回交种(67-1 × *I. batatas* ‘Xushu18’)的 nrDNA ITS 序列分析发现, 杂交种、回交种和母本栽培种甘薯‘徐薯 18’(*I. batatas* ‘Xushu18’)亲缘关系较近, 而与父本 *I. hederacea* Jacq. 的系统发育关系相对较远(图 3)。通过碱基比对发现, 杂交种与母本 *I. batatas* ‘Xushu18’的 nrDNA ITS 序列有 3 个碱基不一致, 而这 3 个碱基与父本 *I. hederacea* Jacq. 相同; 回交种与 *I. batatas* ‘Xushu18’有 3 个碱基不一致, 其中 2 个与 *I. hederacea* Jacq. 相同。王建波等^[30]认为如果杂交和/或多倍化的历史并不长, 同步进化尚未使 nrDNA 的重复单位间发生一致化, 那么杂交种 nrDNA ITS 序列就是双亲序列相加在一起。但由于甘薯杂交种染色体组(4N)中 3N 来自母本 *Ipomoea batatas* (L.) Lam. 1N 来自野生种父本^[29], 导致杂交种基因组更倾向于母本基因组, 因此, 杂交种与回交种的 nrDNA ITS 序列不是两个双亲序列的简单叠加, 而是来源于母本 *I. batatas* ‘Xushu18’的序列更多。这从分子的角度对曹清河等^[29]的结果进行了进一步的阐释, 为甘薯的抗性育种提供了一定的理论基础。

3.4 关于栽培种甘薯的起源

近年来, 对于甘薯的起源研究中, 越来越多的人认为, *I. trifida* 与栽培种甘薯的亲缘关系最近, 极有可能是甘薯的祖先^[31]。另外, *I. triloba* 也被认为是起源祖先之一。我们的研究结果(表 4, 图 3: 分支 I)也表明, *I. batatas* ‘Xushu18’与 *I. trifida*、*I. triloba* 具有较其他近缘野生种更近的亲缘关系。但也有不少研究者认为 *I. triloba* 与栽培种甘薯的亲缘关系较远, 不支持 *I. triloba* 是栽培种甘薯的起源祖先之一, 如 Huang 等^[32]采用分子标记 ISSR、AFLP 和叶绿体 cpDNA 对甘薯属植物

种间关系进行了分析,发现六倍体栽培种甘薯与 *I. trifida* 亲缘关系最近,而与 *I. triloba* 亲缘关系较远。Roullier 等^[33]也采用 SSR 标记和叶绿体 DNA (*rpl32-trnL*) 对栽培种甘薯的起源做了分析与探讨,结果显示,栽培种甘薯与 *I. trifida* 与亲缘关系较近,且很有可能来源于 *I. trifida* 的同源多倍化,而不是由 *I. triloba* 驯化而来的。同时还揭示了栽培种 *I. batatas* 起源多样化,至少包括两种不同的同源多倍化情况,是由一个单独的祖先种进化而来的一群多态性野生种。由以上分析可知, nrDNA ITS 序列分析对于探讨甘薯的起源与进化提供了一定的理论支持,具有一定的参考价值和意义,但还需结合传统的分类方法及多种分子分析手段进行综合研究。

参考文献:

- [1] 李俊,王章英,罗忠霞,陈新亮,房伯平,李育军,刘小红. 分子生物学技术在甘薯育种中的应用[J]. 广东农业科学, 2011, 38(15): 108-112.
- [2] 胡玲,李强,王欣,唐忠厚,李秀英,李洪民,谢逸萍,唐君,曹清河,马代夫. 甘薯地方品种和育成品种的遗传多样性[J]. 江苏农业学报, 2010, 26(5): 925-935.
- [3] 盛家廉,袁宝忠,朱崇文. 高产高抗根腐病甘薯新品种‘徐薯18’的选育[J]. 中国农业科学, 1981, 14(2): 41-45.
- [4] 曹清河,张安,李鹏,李洪民,谢逸萍,李秀英,王欣,马代夫. 甘薯近缘野生种的抗病性鉴定与新型种间杂种的获得[J]. 植物遗传资源学报, 2009, 10(2): 224-229.
- [5] 谢一芝,邱瑞镰,张黎玉,戴起伟,徐品莲,林长平. 国外甘薯种质资源的利用[J]. 作物品种资源, 1992(4): 42-43.
- [6] Zhang DP, Cervantes J, Huaman Z, Carey E, Ghislain M. Assessing genetic diversity of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) cultivars from tropical America using AFLP[J]. *Genet Resour Crop Ev*, 2000, 47(6): 659-665.
- [7] Huang JC, Corke H, Sun M. Highly polymorphic AFLP markers as a complementary tool to ITS sequences in assessing genetic diversity and phylogenetic relationships of sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) and its wild relatives [J]. *Genet Resour Crop Ev*, 2002, 49(6): 541-550.
- [8] Veasey EA, Borges A, Rosa MS, Queiroz-Silva JR, Bressan E de A, Peroni N. Genetic diversity in Brazilian sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam., Solanales, Convolvulaceae) landraces assessed with microsatellite markers [J]. *Genet Mol Biol*, 2008, 31(3): 725-733.
- [9] Roullier C, Kambouo R, Paofa J, Mckey D, Lebot V. On the origin of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) genetic diversity in New Guinea, a secondary centre of diversity [J]. *Heredity* (Edinb), 2013, 110: 594-604.
- [10] Roullier C, Benoit L, McKey DB, Lebot V. Historical collections reveal patterns of diffusion of sweet potato in Oceania obscured by modern plant movements and recombination [J]. *PNAS*, 2013, 110(6): 2205-2210.
- [11] Baldwin BG, Sanderson MJ, Porter JM, Wojciechowski MF, Campbell CS, Donoghue MJ. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny [J]. *Ann Mo Bot Gard*, 1995, 82(2): 247-277.
- [12] 田保华,王永勤,裴雁曦. 应用 ITS 序列分析葱属植物发育关系 [J]. 山西大学学报: 自然科学版, 2013, 36(2): 261-266.
- [13] 张靠稳,杨振华,刘建利,马爱瑛. 四种贺兰山紫蘑菇 rDNA ITS 序列分析 [J]. 生物技术通报, 2011(12): 88-91.
- [14] 刘峥,张汉尧. 旋花科植物 ITS 序列分析 [J]. 西部林业科学, 2012, 41(4): 70-74.
- [15] Miller RE, McDonald JA, Manos PS. Systematics of *Ipomoea* subgenus *Quamoelit* (Convolvulaceae) based on ITS sequence data and a Bayesian phylogenetic analysis [J]. *Am J Bot*, 2004, 91(8): 1208-1218.
- [16] 王晓峰,刘娜娜,季孔庶. 黄杨属植物 ITS 序列分子进化特点分析 [J]. 分子植物育种, 2011, 9(4): 506-513.
- [17] Doyle JJ, Doyle JL. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. *Phytochemical Bulletin*, 1987(19): 11-15.
- [18] Goryunova SV, Chikida NN, Gori M, Kochieva EZ. Analysis of nucleotide sequence polymorphism of internal transcribed spacers of ribosomal

- genes in diploid *Aegilops* (L.) Species[J]. *Mol Biol*, 2005, 39(2): 173–176.
- [19] 栗丹, 李振坚, 毛萍, 严雪锋, 淳泽, 马欣荣. 基于 ITS 序列石斛材料的鉴定及系统进化分析[J]. 园艺学报, 2012, 39(8): 1539–1550.
- [20] Grajales A, Aguilar C, Sánchez JA. Phylogenetic reconstruction using secondary structures of Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2, rDNA): finding the molecular and morphological gap in Caribbean gorgonian corals[J]. *BMC Evol Biol*, 2007, 7: 90.
- [21] Balasubramani SP, Goraya GS, Venkatasubramanian P. Development of ITS sequence-based markers to distinguish *Berberis aristata* DC. from *B. yceum* Royle and *B. asiatica* Roxb[J]. *3 Biotech*, 2011, 1(1): 11–19.
- [22] 宋葆华, 陈之端, 汪小全, 李法曾. 中国菟属 nrDNA 的 ITS 序列分析及其系统学意义[J]. 植物学报, 2000, 42(11): 1184–1189.
- [23] 周阿涛, 岳亮亮, 李旻, 刘迪秋, 丁元明. 云南山茶 (*Camellia reticulata*) nrDNA ITS 序列多态性分析[J]. 植物科学学报, 2013, 31(1): 1–10.
- [24] 董洋龙, 於林江, 周拓, 郑红玉, 王晓锋. 基于 ITS 技术的 11 个茶花品种遗传多样性分析[J]. 中国农学通报, 2013, 29(13): 145–149.
- [25] 雷天刚, 何永睿, 彭爱红, 许兰珍, 姚利晓, 邹修平, 刘小丰, 陈善春. 甜橙核糖体 DNA ITS 序列分析[J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2013, 35(8): 55–60.
- [26] 董若铖, 陈祥平, 范小敏, 张国正, 柯皓天, 梁燕梅, 陈仁芳. 四川几个特色桑品种 ITS 序列与亲缘关系分析[J]. 四川蚕业, 2012, 40(2): 4–7.
- [27] 欧立军, 张人文, 谈智文, 赵婷婷, 余朝文. 我国不同地区天门东核 DNA ITS 序列分析[J]. 中草药, 2011, 42(7): 1042–1046.
- [28] 刘磊, 周广麟, 李长田, 金华. 不同地区松茸 ITS 序列分析及系统发育研究[J]. 中国食用菌, 2011, 30(6): 45–48.
- [29] Cao QH, Zhang A, Ma DF, Li HM, Li Q, Li P. Novel interspecific hybridization between sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) and its two diploid wild relatives[J]. *Euphytica*, 2009, 169: 345–352.
- [30] 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.
- [31] Srisuwan S, Sihachakr D, Yakovlev SS. The origin and evolution of sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.) and its wild relatives through the cytogenetic approaches[J]. *Plant Sci*, 2006, 171(3): 424–433.
- [32] Huang JC, Sun M. Genetic diversity and relationships of sweetpotato and its wild relatives in *Ipomoea* series *Batatas* (Convolvulaceae) as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) and restriction analysis of chloroplast DNA[J]. *Theor Appl Genet*, 2000, 100(7): 1050–1060.
- [33] Roullier C, Duputié A, Wennekes P, Benoit L, Bringas VMF, Rossel G, Tay D, McKey D, Lebot V. Disentangling the origins of cultivated sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) [J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e62707.

(责任编辑: 刘艳玲)