

4种薯蓣属植物的分子鉴别和亲缘关系研究

郭文, 郭华春*

(云南农业大学薯类作物研究所, 昆明 650201)

摘要: 为揭示薯蓣属植物的亲缘关系, 根据叶绿体 *matK*、*rbcL*、*trnL-F* 和 *psbA-trnH* 序列片段, 对小花盾叶薯蓣(*Dioscorea sinopatviflora*)、盾叶薯蓣(*D. zingibiernsis*)、黄独(*D. bulbifera*)和山药(*D. polystachya*)进行种间分子鉴别研究, 并探讨这 4 个片段在薯蓣属植物系统发育上的意义。结果表明, 4 种薯蓣属植物共 22 份材料的 *matK*、*rbcL*、*trnL-F* 和 *psbA-trnH* 序列片段的长度分别为 1026 ~ 1142 bp、1156 ~ 1178 bp、744 ~ 822 bp 和 355 ~ 599 bp。用 PAUP 4.0b10 和贝叶斯推断构建的系统发育树分析表明, 云南的黄独与盾叶薯蓣的亲缘关系较近; 小花盾叶薯蓣与盾叶薯蓣的亲缘关系很近; 而非非洲的黄独与云南的黄独的亲缘关系很远。但仅用这 4 个 cpDNA 片段还不能完全区分小花盾叶薯蓣和盾叶薯蓣, 这说明基于这 4 个序列片段的系统发育证据与 4 种薯蓣属植物属内的分类划分并不十分吻合。

关键词: 薯蓣属; cpDNA; 分子鉴别; 亲缘关系

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2014.03.003

Molecular Identification and Relationship of Four Species in Genus *Dioscorea*

GUO Wen, GUO Hua-chun*

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

Abstract: In order to reveal the relationship of *Dioscorea* species, the interspecific molecular identification of 4 *Dioscorea* species, including *D. sinopatviflora*, *D. zingibiernsis*, *D. bulbifera*, and *D. polystachya*, were studied based on 4 cpDNA fragments, such as *matK*, *rbcL*, *trnL-F* and *psbA-trnH*, and these fragments on phylogenetic significance of *Dioscorea* genus was discussed. The results showed that the length of *matK*, *rbcL*, *trnL-F* and *psbA-trnH* fragments were 1026 – 1142 bp, 1156 – 1178 bp, 744 – 822 bp, 355 – 599 bp, respectively. According to the phylogenetic tree constructed by Bayesian Inference and PAUP 4.0b10 software, it was indicated that the genetic relationship of *D. bulbifera* in Yunnan was close to *D. zingibiernsis*, *D. sinopatviflora* was close to *D. zingibiernsis*, while that of *D. bulbifera* in Africa was far to *D. bulbifera* in Yunnan. In addition, it couldn't be completely distinguished *D. sinopatviflora* and *D. zingibiernsis* in the phylogenic tree by 4 combined fragments. So, it was suggested that the phylogeny evidence based on four fragments was not consistent with taxonomic classification of four species in *Dioscorea*.

Key words: *Dioscorea*; cpDNA; Molecular identify; Relationship

薯蓣科(Dioscoreaceae)植物全世界约有 9 属 650 种, 广布于全球的热带和温带地区, 尤以美洲热

带地区的种类较多。我国只有薯蓣属(*Dioscorea*) 1 属, 约有 49 种^[1-3]。《中国植物志》将薯蓣属植物划

收稿日期: 2013-08-19 接受日期: 2013-12-06

基金项目: 云南省教育厅科学研究基金项目(2012J074)资助

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

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: ynghc@126.com

分为6组,而《Flora of China》^[4]将宽果薯蓣(*Dioscorea garrettii*)和白薯蓣(*Dioscorea hispida*)各列为1组,划分为8组,分别为:根状茎组(sect. *Stenophora*)、宽果薯蓣组(sect. *Stenocorea*)、丁字形毛组(sect. *Combilium*)、顶生翅组(sect. *Shannicorea*)、基生翅组(sect. *Opsophyton*)、复叶组(sect. *Botryosicyos*)、白薯蓣组(sect. *Lasiophyton*)和周生翅组(sect. *Enantiophyllum*)。小花盾叶薯蓣(*D. sinopatviflora* C. T. Ting.)和盾叶薯蓣(*D. zingibiernsis* C. H. Wright.)同属于根状茎组,含有薯蓣皂素,都是我国的特有种,是合成甾体激素药物的首选原料。黄独(*D. bulbifera* L.)为基生翅组,在我国的分布也很广泛,但黄独的形态变异较大, Kunth^[1-2]在黄独种下设立8变种。周生翅组植物薯蓣(*D. polystachya* Turcz., 俗称山药),在我国分布较广,常生于海拔150~1500 m的山坡、山谷林下、溪边、路旁灌木丛或杂草丛中,有多种栽培种和野生种^[5]。

随着现代生物技术的迅速发展,许多药用植物都开始采用分子手段进行鉴定,越来越多的植物也选用多种DNA片段来进行分子鉴别。*rbcL*片段用于远缘间及科级以上分类群的研究^[6-9]。*matK*片段^[10]可以很好地解决被子植物中科级水平的系统关系^[11-12]。为增强分子系统树的可靠性,*trnL-F*片段常用于被子植物科下水平的系统学研究,*psbA-trnH*片段^[13]常用于植物组间及种间的系统发育研究。目前采用以上4个片段相结合进行植物系统学的研究报道已有不少。Potter等^[14]应用6个核基因和*matK*、*rbcL*、*ndhF*、*trnL-F*等4个叶绿体DNA(cpDNA)片段对蔷薇科(Rosaceae)植物进行了全面的分析,获得了更高的分支支持率。孙华钦等^[15]认为仅采用*psbA-trnH*片段不能用于穿龙薯蓣(*D. nipponica*)、黄山药(*D. panthaica*)和盾叶薯蓣种下水平的分类鉴定及系统研究,即不能区分薯蓣属植物种内不同产地的类群。郑玉红等^[16]采用*trnL-F*和*rbcL*序列对薯蓣属山药原植物薯蓣进行了分子鉴别。Gao等^[17]则认为将*matK*、*rbcL*和*trnL-F*序列相结合可以鉴别薯蓣属根状茎组植物的种间关系。Wilki等^[18]分析了67种薯蓣属植物的*matK*和*rbcL*序列,但仅盾叶薯蓣1种是在中国采集的。

本研究对小花盾叶薯蓣、盾叶薯蓣、黄独和山药4种薯蓣属植物cpDNA的*matK*、*rbcL*、*trnL-F*和*psbA-trnH*片段的序列进行分析,探讨这些片段对这4种植物种间的分子鉴别和亲缘关系的作用,

为薯蓣属植物的系统发育研究提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

对采自非洲,云南永胜、禄丰、迪庆、漾濞、元谋以及陕西安康、咸阳的小花盾叶薯蓣(*Dioscorea sinopatviflora* C. T. Ting.)、盾叶薯蓣(*D. zingibiernsis* C. H. Wright.)、黄独(*D. bulbifera* L.)和山药(*D. polystachya* Turcz.)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行繁殖栽培。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 总DNA提取

试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^[19],用4×CTAB代替2×CTAB提取液,并在其中加入1%PVP和2%的β-巯基乙醇。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℃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半个小时以上,10800×g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,在-20℃下保存。

1.3 PCR扩增

以总DNA为模板,进行4个叶绿体片段*matK*、*trnL-F*、*rbcL*和*psbA-trnH*的PCR扩增,扩增引物见表2,采用MOP纯化方式。MOP方式是在纯化柱中装有对固相载体5'-羟基的保护基团DMT具有亲和力的树脂,合成时保留5'端最后一个碱基,合成的引物吸附在纯化柱后,利用低浓度的有机溶剂清洗,带有DMT基团的片段吸附力强,不易被洗脱,然后使用三氟乙酸(TFA)或三氯乙酸(TCA)去除DMT,再用高浓度的有机溶液将引物洗脱下来,从而达到纯化的目的,可满足常规PCR、测序、全基因合成的实验要求。

扩增反应在Tpferrional PCR仪上进行。反应体系的总体积为50 μL,包含dNTP(dATP、dCTP、dGTP和dTTP各2.5 mmol L⁻¹)0.3 μL,正向和反向引物(0.25 μmol L⁻¹)各2 μL,1 U Taq DNA聚合

表 1 材料来源

Table 1 Source of materials

编号 No.	植物 Species	株系 Line	来源 Origin	产地 Location
1	小花盾叶薯蓣	映华 Yinghua	栽培种 Cultivar	云南永胜 Yongsheng, Yunnan
2	<i>Dioscorea sinoparviflora</i>	B-20-6	栽培种 Cultivar	云南永胜 Yongsheng, Yunnan
3		B-21-6	栽培种 Cultivar	云南永胜 Yongsheng, Yunnan
4		盾叶薯蓣	野生种 Wild	陕西安康 Ankang, Shaanxi
5	<i>D. zingiberensis</i>	池河 Chihe	栽培种 Cultivar	陕西安康 Ankang, Shaanxi
6		红卫 Hongwei	栽培种 Cultivar	陕西安康 Ankang, Shaanxi
7		A-02-6	栽培种 Cultivar	云南永胜 Yongsheng, Yunnan
8		A-05-6	栽培种 Cultivar	云南漾濞 Yangbi, Yunnan
9		A-07-3-1	栽培种 Cultivar	云南永胜 Yongsheng, Yunnan
10		A-9-2-1	栽培种 Cultivar	云南永胜 Yongsheng, Yunnan
11		A-9-3	栽培种 Cultivar	云南永胜 Yongsheng, Yunnan
12		A-9-4	栽培种 Cultivar	云南永胜 Yongsheng, Yunnan
13		A-9-5	栽培种 Cultivar	云南永胜 Yongsheng, Yunnan
14		A-10	栽培种 Cultivar	云南永胜 Yongsheng, Yunnan
15	黄独	非洲 Africa	栽培种 Cultivar	非洲 Africa
16	<i>D. bulbifera</i>	云南 Yunnan	栽培种 Cultivar	云南 Yunnan
17		山药	野生种 Wild	甘肃天水 Tanshui, Gansu
18	<i>D. polystachya</i>	咸阳 Xianyang	栽培种 Cultivar	陕西安康 Ankang, Shaanxi
19			野生种 Wild	云南永胜 Yongsheng, Yunnan
20		禄丰 Lufeng	栽培种 Cultivar	云南禄丰 Lufeng, Yunnan
21			野生种 Wild	云南迪庆 Diqing, Yunnan
22			野生种 Wild	云南元谋 Yuanmou, Yunnan

表 2 扩增和测序引物及退火温度

Table 2 Primers and annealing temperature

位点 Loci	引物 Primer	序列 Sequence (5' ~ 3')	退火温度 Annealing temperature (°C)
<i>trnL-F</i>	c	CGAAATCGGTAGACGCTACG	56
	f	ATTGAACTGGTGACACGAG	
<i>rbcL</i>	mF	TATCTTAGCGCCATTCGAGTA	54
	mR	CGCGGATAATTCATTACTTC	
<i>matK</i>	MF	ATTGCGATCTATTCATTCAAT	52
	MR	TGAGATTCGCGAGGTCATT	
<i>psbA-trnH</i>	F1	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	52
	R1	CGCGCATGGTGGATTCACAAATC	

酶 0.5 μ L, 10 \times Taq 缓冲液 5 μ L, 以 ddH₂O 补齐。PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 然后 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min; 60 $^{\circ}$ C 退火 1 min; 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 共 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。取 3 μ L PCR 产物在

1.5% 琼脂糖凝胶上用 1 \times TBE 电泳缓冲液电泳, 经 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]进行比较。

1.4 测序

PCR产物经染色和1.5%琼脂糖凝胶电泳检测之后,送往北京六合华大基因进行双向测序,测序引物为PCR引物。

1.5 数据分析

将测序所得的所有序列用ClustalX^[20]进行排序,之后再在Bioedit^[21]中进行必要的手工排序和调整。矩阵中的空位(gap,“-”)作为缺失(Missing data)处理。对4条序列片段分别进行单独及联合序列矩阵构建。

将处理好的矩阵输入PAUP 4.0b10 for MAC软件^[22],用简约法(Maximum parsimony, MP)进行系统发育分析,所有性状视为无序和加权。采用启发式搜索(Heuristic search) 1000次抽样, TBR(进化树对分重接, Tree bisection reconnection)枝长交换,每步保留10棵树,同时CI(一致性指标, Consistency index)、RI(保留指数, Retention index)和RC(校正一致性指数, Rescaled consistency index)值被估计。获取50%一致性系统进化树(50% Majority rule consensus tree)进行靴带法(Bootstrap analysis)检测^[23], 1000次抽样,根据靴带支持率(Bootstrap, BS)评估各分支可靠性。BS ≤ 50为不支持;BS = 51 ~ 75为低支持, BS = 76 ~ 85为中度支持;BS ≥ 85为高支持或强烈支持。

Bayesian推断(Bayesian inference, BI)是基于4种

薯蓣属植物22个居群的4条叶绿体基因序列片段的特征信息,利用MrBayes 3.1.2软件^[24-25]完成系统发育树,用Modeltest 3.06软件^[26]进行模型选择,4条片段联合分析选择的AIC最适模型为TPM1uf+G [Base = (0.3058, 0.1937, 0.1948, 0.3057), Nst = 6, Rmat = (1.0000, 1.7171, 1.7373, 1.7373, 1.7171, 1.0000), Rates = gamma, Shape = 0.0130, Ncat = 4, Pinvar = 0]。以随机选择的进化树为起始树,马尔科夫链的蒙特卡罗方法(Markov chain Monte Carlo process)设置为4条链同时独立进行,3条热链,1条冷链。4条片段序列矩阵联合分析运行100万代,每100代取样1次,摒弃前1000次老花样本(Burn-in samples)。用剩余样本构建50%一致性树并计算各分支的后验概率(Posterior probability, PP)^[24]。后验概率值PP < 0.95视为低或较弱的支持,将PP ≥ 0.95视为高或好的支持。

2 结果和分析

2.1 *matK*、*trnL-F*、*rbcL*及*psbA-trnH*片段的扩增

本研究对4种薯蓣属植物22份材料的叶绿体*matK*、*trnL-F*、*rbcL*及*psbA-trnH*片段进行PCR扩增,获得22个样品的*matK*、*trnL-F*、*rbcL*及*psbA-trnH*片段的扩增产物,经1.5%琼脂糖凝胶电泳检测后进行测序。各类群的4条片段长度及碱基G+C含量见表3。

表3 薯蓣属植物4条片段的扩增结果

Table 3 Amplification of 4 fragments from *Dioscorea* species

编号 No.	<i>matK</i> (bp)	<i>rbcL</i> (bp)	<i>trnL-F</i> (bp)	<i>psbA-trnH</i> (bp)	总长度 Total length (bp)	G + C (%)
1	1035	1175	798	593	3290	36.9
2	1035	1160	744	589	3294	36.9
3	1030	1176	799	590	3268	37.0
4	1033	1169	797	590	3276	37.1
5	1060	1168	798	590	3237	36.9
6	1127	1169	796	587	3270	37.0
7	1049	1171	812	599	3265	37.0
8	1142	1178	798	580	3262	36.9
9	1041	1165	797	587	3488	36.7
10	1076	1170	797	578	3435	36.6
11	1127	1164	796	575	3475	36.5
12	1049	1167	808	575	3479	36.8

续表(Continued)

编号 No.	<i>matK</i> (bp)	<i>rbcL</i> (bp)	<i>trnL-F</i> (bp)	<i>psbA-trnH</i> (bp)	总长度 Total length (bp)	G + C (%)
13	1033	1162	815	576	3491	36.9
14	1034	1176	799	577	3455	36.7
15	1036	1167	811	372	3467	36.7
16	1034	1169	822	372	3466	36.7
17	1030	1156	796	367	3480	36.8
18	1063	1167	810	367	3448	36.7
19	1039	1164	758	368	3507	36.9
20	1036	1167	795	355	3509	36.9
21	1034	1162	788	366	3495	36.8
22	1026	1169	805	361	3481	37.6

1~22 见表 1。

1-22 see Table 1.

从表 3 可见，4 种薯蓣属植物的 22 份材料的 4 条叶绿体基因片段(*matK*、*rbcL*、*trnL-F* 和 *psbA-trnH*)长度分别为 1026~1142 bp、1156~1178 bp、744~822 bp、355~599 bp。经对比切齐后加上 gap,这 22 份材料的 4 条片段总长度在 3262~3509 bp 之间,且碱基 G+C 含量为 36.5%~37.6%。

2.2 序列特征

图 1 是 4 种薯蓣属植物 4 条片段中具代表性

的序列比对结果。

将每个材料的这 4 条片段分别加上 gap 再进行拼接,总长度为 5315 bp。经计算,其中 5165 个位点没有变异,在 150 个变异位点中有 144 个简约信号位点(Parsimony-informative characters)。将空缺 gap 处理为缺失时,得到了 53 棵步长为 208 的最大简约树,该最大简约树的 CI、RI 和 RC 值分别为 0.8654、0.9265 和 0.8018。

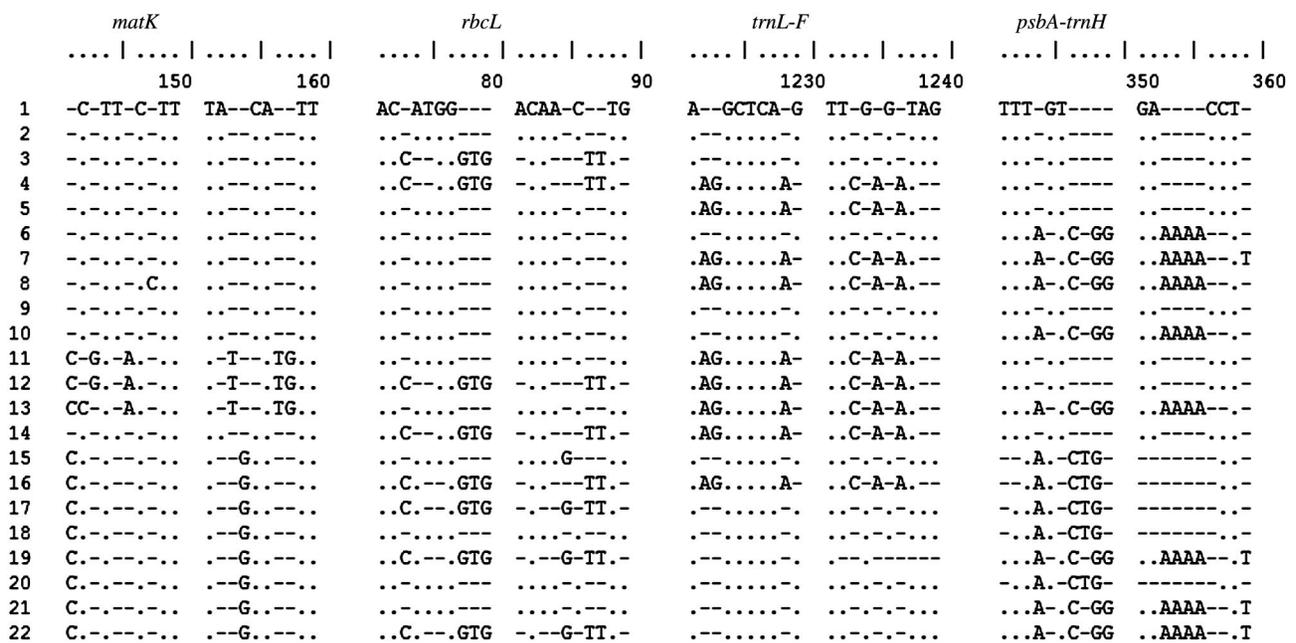


图 1 4 种薯蓣属植物 4 条片段的代表性序列比对。1~22 见表 1。

Fig. 1 Representative sequence alignment of 4 fragments from 4 *Dioscorea* species. 1-22 see Table 1.

2.3 系统发育分析

从图 2 可以看出,基于对 *matK*、*rbcL*、*trnL-F* 和 *psbA-trnH* 联合片段的 MP 和 BI 分析,非洲的黄独单独为一支,而陕西安康的盾叶薯蓣野生种与陕西池河盾叶薯蓣的栽培株系及云南永胜的 A-10、A-9-3、A-9-4、A-9-5、A-05-6、A-02-6 盾叶薯蓣栽培株系以及云南黄独栽培株系聚为一个大的分支,且盾叶薯蓣 3 个栽培株系 A-9-3、A-9-4、A-9-5 的亲缘关系十分近, PP 值和 BS 值都达到 1.00 和 100,均为高支持率;永胜的盾叶薯蓣栽培株系 A-07-3-7 与小花盾叶薯蓣栽培株系 B-20-6、B-21-6、映华聚为一个小的分支(PP 值和 BS 值分别为 0.82 和 66,均为低支持率),然后再与陕西红卫的盾叶

薯蓣栽培株系以及云南永胜的盾叶薯蓣栽培株系 A-09-2-1 聚为一个大的分支,但支持率都不高, PP 值和 BS 值只有 0.72 和 86,分别为低支持率和高支持率。永胜、元谋及迪庆的 3 个山药类群聚为一支,其 PP 值和 BS 值分别为 1.00 和 60,分别为强烈支持和低支持率,且永胜和元谋的野生山药类群又聚成一个小的分支,其 PP 值和 BS 值为 0.92 和 71,均为低支持率,显示这 3 个类群之间的亲缘关系较近。天水、咸阳及云南陆丰的山药栽培株系仅在贝叶斯树中聚为一支,但支持率较低。因此,小花盾叶薯蓣和盾叶薯蓣的所有类群均聚为一个分支,同时云南的黄独也聚在此分支中,支持率 PP 值和 BS 值分别为 1.00 和 59,为强烈支持和低支持率。

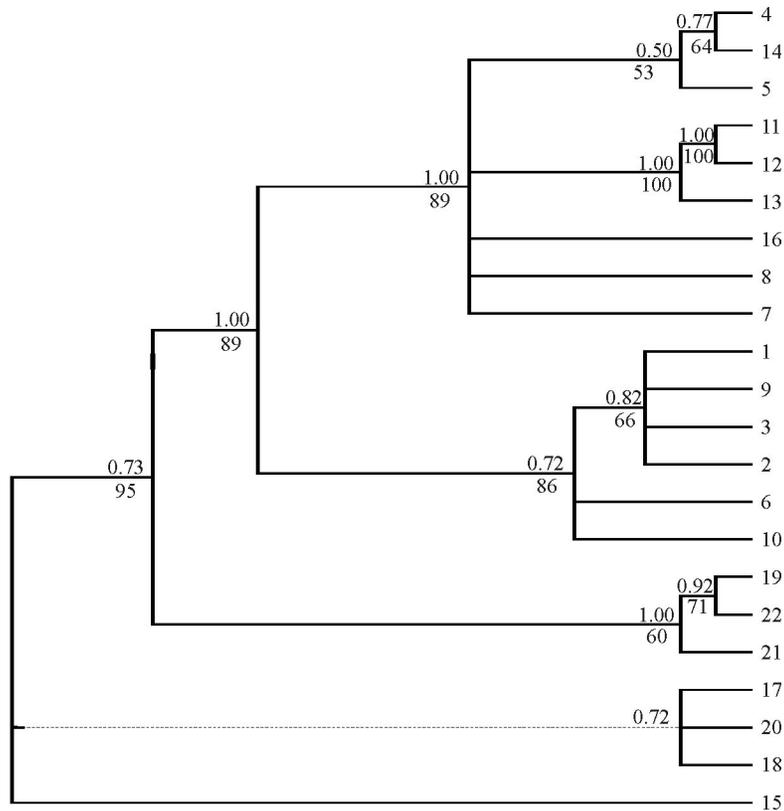


图 2 基于 4 个片段(*matK*、*rbcL*、*trnL-F* 和 *psbA-trnH*)的 4 种薯蓣属植物的亲缘关系严格一致树。分支上下的数值分别为 PP 和 BS。虚线为仅在贝叶斯树中出现。1~22 见表 1。

Fig. 2 Relationship strict consensus tree of 4 *Dioscorea* species based on 4 fragments (*matK*, *rbcL*, *trnL-F* and *psbA-trnH*). Data above and under branches are PP and BS, respectively. Dashed line represents appearance in Bayesian tree only. 1 – 22 see Table 1.

3 讨论

matK、*rbcL*、*trnL-F* 及 *psbA-trnH* 片段是目前植物系统分类和分子鉴别研究中常用的叶绿体保守片段,其 G + C 含量相对较低,本研究的结果也

与此相同。本研究所采用的 4 种薯蓣属植物 22 个分类群(产地)彼此之间的地域距离相隔比较远,这 4 条片段序列具有很好的代表性,可以反映物种的普遍特征。许多研究利用单个片段或联合多个片段对物种的系统学和分子鉴别进行了分析^[13-18],认

为 *matK* 片段的物种分辨率要高于 *rbcL*、*trnL-F* 和 *psbA-trnH* 片段,并推荐 *matK* 作为薯蓣属植物物种鉴定的标准条码^[28],*matK* + *rbcL*为蒟蒻薯属(*Tacca*)的标准条码^[27]。本研究的小花盾叶薯蓣、盾叶薯蓣、黄独和山药是薯蓣属 4 种倍性不同的植物,其中小花盾叶薯蓣与盾叶薯蓣有许多相同的性状,近几年从形态学上才将他们区分开来。

本研究基于分子生物学角度,通过对叶绿体 *matK*、*rbcL*、*trnL-F* 及 *psbA-trnH* 片段的联合分析,所获得的系统树不能将小花盾叶薯蓣与盾叶薯蓣鉴别开来,说明这两种的亲缘关系很近,且叶绿体携带的遗传信息有限。而由于 ITS 序列片段的引物通用性较低,本研究未能将 4 种薯蓣属植物的 ITS 序列片段进行扩增。因此,本研究认为目前在对薯蓣属植物的分类与鉴别时,要同时采用形态学、细胞学、遗传学、系统学等多方面信息。

本研究所得的系统树来看,小花盾叶薯蓣、盾叶薯蓣与云南的黄独聚为一个大的分支,且支持率较高,推测云南的黄独与小花盾叶薯蓣、盾叶薯蓣的亲缘关系较近,而非洲的黄独不在其中。同时,对非洲和云南的黄独主要性状进行调查,非洲的黄独叶色为绿色,宿根为卵圆形,表皮浅灰色,表面密生须根,零余子为浅灰色,个体较大;而云南的黄独叶色为绿色且叶脉处紫红色,宿根卵圆形,表皮棕黑色,密生须根,其零余子为棕黑色,上面分布着细小麻点,且个体较小。Prain^[3]根据零余子、根茎和叶片的形态,认为分布在亚洲的为黄独原变种(*D. bulbifera*);分布于非洲的为变种 *D. bulbifera* var. *anthropophagorun*,因而我们推测非洲的黄独与云南的黄独具有不同的演化过程,这可能与地理分布的差异有关。

元谋、迪庆和永胜的野生山药聚为一支,而甘肃天水的野生山药、陕西咸阳和云南陆丰的栽培山药并不在此分支中,从系统发育树中的 PP 值为 0.72 来看,这三者的亲缘关系较远,我们推测云南陆丰的山药栽培株系与北方的山药亲缘关系较近,可能来源于北方的山药,而其与云南元谋、迪庆和永胜的几个野生山药亲缘关系较远,因此云南本地的野生山药并没有加入到栽培山药的血缘当中。

参考文献

- [1] Knuth R. Dioscoreaceae [M]// Engler A. Das Pflanzenreich. Leipzig: Wilhelm Engelmann, 1924: 1–387.
- [2] Knuth R. Dioscoreaceae [M]// Die Natürliche Pflanzenfamilien. Leipzig: Wilhelm Engelmann, 1930: 438–462.
- [3] Prain D, Burkill I H. An Account of the Genus *Dioscorea* in the East [M]. Dhaka: Bengal Government Press, 1936: 1–85.
- [4] Ding Z, Gilbert M G. Dioscoreaceae [M]// Wu Z, Raven P H. Flora of China, Vol. 24. Beijing: Science Press & St. Louis: Missouri Botanical Garden Press, 2000: 276–296.
- [5] Xu C J. *Dioscorea* Resources in China [M]. Chengdu: Sichuan Science and Technology Press, 2000: 1–349.
徐成基. 中国薯蓣资源 [M]. 成都: 四川科学技术出版社, 2000: 1–349.
- [6] Kress W J, Erickson D L. A two-locus global DNA barcode for land plants: The coding *rbcL* gene complement the none-coding *trnH-psbA* spacer region [J]. PLoS One, 2007, 2(6): e508. doi: 10.1371/journal.pone.0000508
- [7] Fazekas A J, Burgess K S, Kesanakurti P R, et al. Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well [J/OL]. PLoS One, 2008, 3(7): e2802. doi: 10.1371/journal.pone.0002802
- [8] Lahaye R, van der Bank M, Bogarin D, et al. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(8): 2923–2928.
- [9] Newmaster S G, Fazekas A J, Steeves R A D, et al. Testing candidate plant barcode regions in the Myristicaceae [J]. Mol Ecol Res, 2008, 8(3): 480–490.
- [10] Ooi K, Endo Y, Yokoyama J, et al. Useful primer designs to amplify DNA fragments of the plastid gene *matK* from Angiosperm plants [J]. J Jpn Bot, 1995, 70: 328–331.
- [11] Steele K P, Vilgalys R. Phylogenetic analyses of Polemoniaceae using nucleotide sequences of the plasmid gene *matK* [J]. Syst Bot, 1994, 19(1): 126–142.
- [12] Johnson L A, Soltis D E. *matK* DNA sequence and phylogenetic reconstruction in Saxifragaceae s. str. [J]. Syst Bot, 1994, 19(1): 143–156.
- [13] Tian X, Li D Z. Application of DNA sequences in plant phylogenetic study [J]. Acta Bot Yunnan, 2002, 24(2): 170–184.
田欣, 李德铎. DNA序列在植物系统学研究中的应用 [J]. 云南植物研究, 2002, 24(2): 170–184.
- [14] Potter D, Eriksson T, Evans R C, et al. Phylogeny and classification of Rosaceae [J]. Plant Syst Evol, 2007, 266(1/2): 5–43.
- [15] Sun H Q, Luo K, Zou W J, et al. *psbA-trnH* fragment sequence analysis of *Dioscorea nipponica*, *D. panthaica* and *D. zingiberensi* [J]. Chin J Appl Environ Biol, 2006, 12(6): 792–797.
孙华钦, 罗科, 邹文俊, 等. 穿龙薯蓣、黄山药和盾叶薯蓣 *psbA-trnH* 片段序列分析 [J]. 应用与环境生物学报, 2006, 12(6): 792–797.
- [16] Zheng Y H, Xia B, Hang Y Y, et al. Molecular authentication and relationships of *Dioscorea olystachya* Turcz. and its related

- species [J]. *J Nanjing Agri Univ*, 2007, 30(2): 55–59.
- 郑玉红, 夏冰, 杭悦宇, 等. 山药原植物薯蓣及其近缘种的分子鉴别和亲缘关系研究 [J]. *南京农业大学学报*, 2007, 30(2): 55–59.
- [17] 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.
- [18] Wilkin P, Schols P, Chase M W, et al. A plastid gene phylogeny of the yam genus, *Dioscorea*: Roots, fruits and madagascar [J]. *Syst Bot*, 2005, 30(4): 736–749.
- [19] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. *Phytochem Bull*, 1987, 19(11): 11–15.
- [20] Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. ClustalX: Multiple sequence alignment program, Version 1.83 [CP]. Bethesda, Maryland: National Center for Biotechnology Information, 1998.
- [21] Hall T A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows95/98/NT [J]. *Nucl Acid Symp*, 1999, 41(1): 95–98.
- [22] Swofford D. PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony, version 4.0b10 [CP]. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 2002.
- [23] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap [J]. *Evolution*, 1985, 39(4): 783–791.
- [24] Huelsenbeck J P, Ronquist F. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees [J]. *Bioinformatics*, 2001, 17(8): 754–755.
- [25] Ronquist F, Huelsenbeck J P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models [J]. *Bioinformatics*, 2003, 19(12): 1572–1574.
- [26] Posada D, Crandall K A. Modeltest: Testing the model of DNA substitution [J]. *Bioinformatics*, 1998, 14(9): 817–818.
- [27] Zhao Y M, Zhang L. Using DNA barcoding in genus *Tacca* (Dioscoreaceae) [J]. *Plant Divers Res*, 2011, 33(6): 674–682.
- 赵月梅, 张玲. 蒟蒻薯属(薯蓣科)植物DNA条形码研究 [J]. *植物分类与资源学报*, 2011, 33(6): 674–682.
- [28] 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/OL]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e32057. doi: 10.1371/journal.pone.0032057