

王崇, 王连军, 田小海, 等. 基于 mtDNA 和 cpDNA 序列的甘薯栽培种及近缘野生种分析 [J]. 华南农业大学学报, 2021, 42(4): 25-32.
WANG Chong, WANG Lianjun, TIAN Xiaohai, et al. Analyses of *Ipomoea batatas* cultivated species and wild relatives based on mtDNA and cpDNA sequences[J]. Journal of South China Agricultural University, 2021, 42(4): 25-32.

基于 mtDNA 和 cpDNA 序列的甘薯栽培种及近缘野生种分析

王 崇^{1,2†}, 王连军^{1†}, 田小海², 雷 剑¹, 柴沙沙¹, 焦春海³, 杨新笋¹

(1 湖北省农业科学院 粮食作物研究所/湖北省甘薯工程技术研究中心/粮食作物种质创新与遗传改良湖北省重点实验室, 湖北 武汉 430064; 2 长江大学 农学院, 湖北 荆州 434000; 3 湖北省农业科学院, 湖北 武汉 430064)

摘要:【目的】利用线粒体 DNA(Mitochondrial DNA, mtDNA) 序列和叶绿体 DNA(Chloroplast DNA, cpDNA) *matK* 序列对甘薯 *Ipomoea batatas* 栽培种及近缘野生种进行分子鉴定和亲缘关系分析, 为甘薯栽培种和近缘野生种的种质鉴定、保护及开发利用提供理论依据。【方法】以 3 个甘薯栽培种及 8 个近缘野生种为材料, 采用 CTAB 法提取基因组 DNA, 通过 PCR 扩增 mtDNA 序列和 cpDNA *matK* 序列, 使用 DnaSP 6.0 对序列进行核苷酸多态性、单倍型多样性等特征分析, 并基于邻接法构建 3 个甘薯栽培种及 8 个近缘野生种的系统发育进化树。【结果】5 个 mtDNA 序列和 cpDNA *matK* 序列经测序、比对、拼接后, 长度为 6 713 bp, GC 占比在 47.79%~48.31% 之间。合并序列的单倍型数量、核苷酸多态性、变异位点数量、单一突变位点数量、简约信息位点数量和插入/缺失位点数量分别为 9、0.003 25、69、39、30 和 111。中性检验显示, 合并序列差异不显著 ($P > 0.10$), 遵循中性进化模型。3 个甘薯栽培种及 8 个近缘野生种间的遗传距离在 0.000 00~0.005 84 之间, 平均遗传距离 0.003 26, 遗传多样性较低; 按照亲缘关系被分为 2 大类, 各大类内部亲缘关系较近。【结论】本研究采用的序列可对甘薯栽培种和近缘野生种进行准确的鉴定区分, 为甘薯近缘野生种的进化和利用提供参考和理论指导。

关键词: 甘薯; 线粒体 DNA; *matK* 序列; 系统发育; 遗传多样性

中图分类号: S531

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2021)04-0025-08

Analyses of *Ipomoea batatas* cultivated species and wild relatives based on mtDNA and cpDNA sequences

WANG Chong^{1,2†}, WANG Lianjun^{1†}, TIAN Xiaohai², LEI Jian¹, CHAI Shasha¹, JIAO Chunhai³, YANG Xinsun¹
(1 Institute of Food Crops, Hubei Academy of Agricultural Sciences/Hubei Engineering and Technology Research Center of Sweetpotato/Hubei Key Laboratory of Food Crop Germplasms and Genetic Improvement, Wuhan 430064, China; 2 College of Agriculture, Yangtze University, Jingzhou 434000, China; 3 Hubei Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430064, China)

Abstract: 【Objective】 To conduct molecular identification and genetic relationship analysis of *Ipomoea batatas* cultivated species and wild relatives based on mitochondrial DNA (mtDNA) and chloroplast DNA (cpDNA) *matK*

收稿日期: 2020-11-23 网络首发时间: 2021-06-03 15:46:18

网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20210602.1740.004.html>

作者简介: 王 崇 (1994—), 男, 博士研究生, E-mail: wangchong199409@163.com; 王连军 (1980—), 男, 副研究员, 博士, E-mail: wanglianjun10@163.com; †表示同等贡献; 通信作者: 焦春海 (1962—), 男, 研究员, 博士, E-mail: jiaoch@hotmail.com; 杨新笋 (1967—), 男, 研究员, 博士, E-mail: yangxinsun013@163.com

基金项目: 国家重点研发计划 (2019YFD1001300, 2019YFD1001304, 2019YFD1001305); 粮食作物种质创新与遗传改良湖北省重点实验室开放课题 (国家现代甘薯产业技术体系建设项目)(CARS-11-C-15); 湖北省技术创新专项 (重大项目)(2017ABA149); 湖北省农业科学院特色学科、湖北省农业科技创新中心资助项目 (2007-620-001-03); 湖北省农业科学院青年拔尖人才培养计划

sequences, and provide theoretical bases for germplasm identification, protection, development and utilization.

【Method】 Three cultivated species and eight wild relatives were used as materials, from which total DNA was extracted by the CTAB method. Their mtDNA and cpDNA *matK* sequences were amplified by PCR. DnaSP 6.0 was used to analyze nucleotide diversity, haplotype diversity and other characteristics. The phylogenetic tree of three cultivated species and eight wild relatives was constructed based on the neighbor-joining method.

【Result】 The length of five mtDNA regions and one cpDNA region was 6 713 bp after sequencing, alignment and splicing, the GC proportion was 47.79%–48.31%, and the haplotype number, nucleotide diversity, variable site number, singleton variable site number, parsimony informative site number, insertion/deletion site number were 9, 0.003 25, 69, 39, 30, 111, respectively. The neutrality test showed there was no significant difference between Tajima's *D* values at the level of $P > 0.10$, which indicated that variation of those regions followed neutral theory of molecular evolution. The genetic distances among three cultivated species and eight wild relatives ranged from 0.000 00 to 0.005 84, with an average genetic distance of 0.003 26, indicating low genetic diversity. The phylogenetic tree divided the 11 species into two categories with close genetic relationship within the category.

【Conclusion】 The sequences used in this study can accurately identify *I. batatas* cultivated species and wild relatives, and provide references and theoretical guidance for the evolution and utilization of *I. batatas* wild relatives.

Key words: *Ipomoea batatas*; mitochondrial DNA; *matK* sequence; phylogeny; genetic diversity

甘薯 *Ipomoea batatas* 是旋花科 Convolvulaceae 番薯薯 *Ipomoea* 双子叶植物, 主要起源于南美洲等热带、亚热带地区, 是世界第七大粮食作物、中国第五大粮食作物^[1]。甘薯富含蛋白质、脂肪、多糖、维生素、胡萝卜素、花青素、氨基酸、钙、磷、钾等多种物质, 营养价值丰富^[2-3]。甘薯抗旱性强, 耐贫瘠能力强, 具有极强的适应性, 在中国具有悠久的栽培历史^[4]。甘薯是无性繁殖作物, 染色体数目多, 遗传背景复杂, 在遗传上高度杂合, 中国的甘薯栽培种 94% 以上具有‘南瑞苕’和‘胜利百号’的遗传信息, 造成中国甘薯遗传背景狭窄, 严重制约甘薯品种的遗传改良^[5]。甘薯近缘野生种种质资源丰富, 在世界范围内分布有 600~700 种, 具有丰富的遗传多样性和潜在的基因资源, 如高淀粉含量、抗病虫、抗病毒、抗旱等优良特质, 可为改良甘薯品种和拓宽甘薯基因库提供重要的基因资源^[6-7]。

伴随现代生物技术不断发展、更新, DNA 分子标记技术在植物研究领域广泛应用于植物种质鉴定、遗传多样性分析、指纹图谱构建、亲缘关系鉴定和遗传图谱构建等^[8]。Yang 等^[9]使用 SSR 标记分析了 380 个甘薯品种的遗传多样性和遗传结构; 苏一钧等^[10]筛选出 30 对多态性丰富的 SSR 引物, 对 303 份甘薯地方材料进行了遗传多样性和群体结构分析, 发现 303 份甘薯材料间亲缘关系较近, 遗传多样性丰富; 季志仙等^[11]选用 6 个 ISSR 标记对 17 份甘薯品种进行分析, 显示同类型品种间的

遗传相似性较高, 亲缘关系密切。SSR 和 ISSR 等分子标记技术主要是基于植物基因组 DNA 开发, 在植物亲缘鉴定和遗传背景研究中具有极好的应用价值。随着现代生物技术的发展, 基于线粒体 DNA (Mitochondrial DNA, mtDNA) 和叶绿体 DNA (Chloroplast DNA, cpDNA) 开发的分子标记技术也越来越广泛地应用于植物遗传分析^[12-13]。

mtDNA 具有细胞质遗传特性, 一些 mtDNA 参与编码具有重要生物学功能的蛋白或亚基, 如核糖体和生物氧化链上某些重要酶的部分亚基, 还与细胞生命周期、真核细胞抗药性有关^[14]。在植物细胞中, mtDNA 参与调控子叶大小、叶片形状、植物细胞质雄性不育, 还影响拟南芥、玉米和黄瓜等作物的叶绿体结构以及光合作用^[15-16]。mtDNA 具有进化速度快、缺少重组以及严格母系遗传等特点, 且线粒体基因组较小、易于测序, 已经成为研究植物遗传进化和系统发育的理想工具^[17]。cpDNA 具有单倍型、母系遗传、缺乏杂合细胞质、不发生等位基因重组等特性, 非编码区不受选择影响, 核酸位点表现出丰富的多态性和变异, 与 mtDNA 序列广泛用于研究植物的系统发育、种间或种内的亲缘关系鉴定等研究^[18]。Godbout 等^[19]采用 *nad3*、*nad5* 等 mtDNA 序列对北美短叶松进行了系统发育研究, 结果表明 mtDNA 可反映北美短叶松的地理关系; Hu 等^[20]使用 mtDNA 非编码区序列分析薯蓣属的遗传背景, 结果表明线粒体基因重组时存在丰富的

变异位点,可用于鉴别区分不同薯蕷品种;马丽等^[21]使用 *matK* 基因序列对 59 个石榴品种进行了鉴定和分类,结果表明 *matK* 可用于石榴的系统发育分析。

本研究通过对 3 个甘薯栽培种及 8 个近缘野生种进行 mtDNA 和 cpDNA *matK* 序列分析,综合分析 3 个甘薯栽培种及 8 个近缘野生种的亲缘关系和遗传多样性,为甘薯近缘野生种的保护及利用提供参考,为甘薯遗传育种提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验所用材料为 3 个甘薯栽培种(‘浙紫薯 3 号’‘鄂薯 6 号’‘皖薯 7 号’)及 8 个近缘野生种(何鲁牵牛 *I. holubii*、‘黄葛萝’ *I. hederifolia* var. *lutea*、空心菜 *I. aquatica* Forsk、‘月光花’ *I. alba*、‘黄色朝颜’ *I. obscura* Keniak、变色牵牛 *I. indica*、旋转牵牛 *I. digitata huge caudex*、树牵牛 *I. carnea*), 种植于湖北省农业科学院粮食作物研究所。长势旺盛时进行样品采集。

1.2 DNA 提取

采取试验样品新鲜、幼嫩叶片后,参考 Yang 等^[9]

的方法,使用改良 CTAB 法提取甘薯栽培种及近缘野生种的基因组 DNA。使用分光光度计测量 DNA 的浓度,用 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的质量。将 DNA 质量浓度稀释到 70~80 ng/μL,在 -20 °C 冰箱中保存,备用。

1.3 PCR 扩增

本研究选用 6 对 mtDNA 和 1 对 cpDNA 通用引物(表 1),引物由武汉天一辉远生物科技有限公司合成。将 7 对引物分别在试验材料中进行扩增。PCR 反应扩增体系:10× PAGE Buffer(Mg²⁺)2.5 μL, dNTPs(10 mmol/L)2.0 μL, 正向引物和反向引物各 1.0 μL, 基因组 DNA(70~80 ng/uL)1.0 μL, EasyTaq[®] DNA Polymerase 0.5 μL, ddH₂O 补至总体积为 25 μL。PCR 扩增程序:94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 56~57 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 5 min; 在 4 °C 条件下保存 5 min。使用 15 g/L 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增结果,以单一、清晰、明亮条带作为检测标准,将检测合格的扩增产物送到武汉天一辉远生物科技有限公司进行双向测序。

表 1 试验采用引物信息
Table 1 The information of primers used in this experiment

类别	基因序列	引物	片段大小/bp	退火温度/°C	参考文献
Species	Gene sequence	Primer	Fragment size	Annealing temperature	Reference
mtDNA	<i>ccb203</i>	F: ASGTTCTACGGACCGATGCC	500	57	[22]
		R: CACGGGGAGGGAGCRGGCGA			
	<i>ccb256</i>	F: GGAAGTTAGCAAAGTTAGAC	520	57	[22]
		R: TTGTTCTTAACAGCGATGGC			
	<i>nad2/1-2</i>	F: TTTTCTTCCTCATTCTKATTT	1200	57	[22]
		R: CCACTCTATTGTCCACTTCTA			
<i>nad2/4-5</i>	F: TTCATATAGAATCCATGTCC	1800	57	[22]	
	R: CTATTTGTTCTTCGCCGCTT				
<i>nad5/4-5</i>	F: CCAATTTTTGGCCAATTCC	1400	57	[23]	
	R: CATTGCAAAGGCATAATGAT				
<i>nad7/1-2</i>	F: ACCTCAACATCCTGCTGCTC	1200	57	[23]	
	R: CGATCAGAATAAGGTAAAGC				
cpDNA	<i>matK</i>	F: CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG	1500	57	[24]
		R: ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTTC			

1.4 数据分析

用软件 DNASTAR 对测序结果进行手动校对,删除两端冗余碱基,将正向序列和反向序列进行拼接,使用软件 MEGA X^[25] 对拼接好的序列进行比对,使用软件 DnaSP 6.0^[26] 对序列进行多态性 (π) 和

单倍型 (H_d) 等序列特征分析。使用 MEGA X 软件采用邻接距离矩阵法 (Neighbor-joining distance matrix method) 构建系统发育进化树,使用自展法 (Bootstrap) 进行可信度检测,重复 1000 次。使用软件 NetWork 的中介邻接网络 (Median-joining

network, MJ) 算法构建单倍型关联图。

2 结果与分析

2.1 序列特征分析

对 6 个 mtDNA 序列和 cpDNA *matK* 序列的测序结果进行多态性分析, mtDNA 序列 *ccb256* 在 3 个甘薯栽培种及 8 个近缘野生种中无碱基差异, 其余 6 个序列表现出多态性。对表现出多态性的序列进行分析, 将 *ccb203*、*nad2/1-2*、*nad2/4-5*、*nad5/4-5*、*nad7/1-2* 和 *matK* 在 11 个材料中的扩增序列进行对位排列后, 上述序列的长度分别为 494、1 247、1 503、1 665、964 和 840 bp。6 个序列扩增片段 GC 碱基占比分别为 46.52%~47.17%、53.90%~54.69%、48.02%~48.54%、45.93%~46.50%、56.39%~57.23% 和 32.90%~34.09%。在 5 个线粒体序列中, 序列 *nad5/4-5* 的核酸多态性最高 (0.003 95), 含有 20 个变异位点、10 个单一突变位点、10 个简约信息位点、6 个插入/缺失位点。*ccb203*、*nad2/1-2*、*nad2/4-5* 和 *nad7/1-2* 序列的核苷酸多态性、变异位点数、单一突变位点数、简约信息位点数和插入/缺

失位点数分别为 0.003 20、0.000 17、0.003 43、0.001 86、5、1、12、4、2、1、3、0、3、0、9、4、6、11、63、24。*matK* 序列的核苷酸多态性、变异位点数、单一突变位点数比 mtDNA 序列的高, 简约信息位点数和插入/缺失位点数比 mtDNA 序列的低。6 个序列合并后, 序列长度为 6 713 bp, 共有变异位点 69 个, 其中单一突变位点 39 个、简约信息位点 30 个, 插入/缺失位点 111 个 (表 2)。

ccb203、*nad2/1-2*、*nad2/4-5*、*nad5/4-5*、*nad7/1-2* 和 *matK* 序列中, 单倍型数量最多的是 cpDNA 序列 *matK*, 9 个; *ccb203*、*nad2/1-2*、*nad2/4-5*、*nad5/4-5* 和 *nad7/1-2* 的单倍型数量分别是 5、2、8、8 和 5。6 个序列的单倍型多样性分别为 0.818、0.182、0.927、0.927、0.818 和 0.945, *matK* 区域的单倍型多样性最高。单倍型多样性方差和单倍型多样性标准差最大的区域是 *nad2/1-2*, 分别为 0.020 61 和 0.144。6 个序列合并后, 单倍型数量、单倍型多样性、单倍型多样性方差和单倍型多样性标准差分别是 9、0.945、0.004 34 和 0.066 (表 3)。

对 6 个序列进行 Tajima's *D* 测验和 Fu and Li's

表 2 试验材料的序列多态性信息

Table 2 Sequence polymorphism information of experiment materials

基因序列 Gene sequence	长度/ bp Length	GC占 比/% GC proportion	核苷酸多态性 Nucleotide diversity	变异位点数 Variable site number	单一突变位点数 Singleton variable site number	简约信息位点数 Parsimony informative site number	插入/缺失位点数 Insertion/ deletion site number
<i>ccb203</i>	494	46.52~47.17	0.003 20	5	2	3	6
<i>nad2/1-2</i>	1 247	53.90~54.69	0.000 17	1	1	0	11
<i>nad2/4-5</i>	1 503	48.02~48.54	0.003 43	12	3	9	63
<i>nad5/4-5</i>	1 665	45.93~46.50	0.003 95	20	10	10	6
<i>nad7/1-2</i>	964	56.39~57.23	0.001 86	4	0	4	24
<i>matK</i>	840	32.90~34.09	0.007 11	27	23	4	1
合并 Total	6 713	47.79~48.31	0.003 25	69	39	30	111

表 3 试验材料的单倍型多样性

Table 3 Haplotype diversity of experiment materials

基因序列 Gene sequence	单倍型数量 Haplotype number	单倍型多样性 Haplotype diversity	单倍型多样性方差 Variance of haplotype diversity	单倍型多样性标准差 Standard deviation of haplotype diversity
<i>ccb203</i>	5	0.818	0.006 82	0.083
<i>nad2/1-2</i>	2	0.182	0.020 61	0.144
<i>nad2/4-5</i>	8	0.927	0.004 42	0.066
<i>nad5/4-5</i>	8	0.927	0.004 42	0.066
<i>nad7/1-2</i>	5	0.818	0.006 82	0.083
<i>matK</i>	9	0.945	0.004 34	0.066
合并 Total	9	0.945	0.004 34	0.066

D/F**测验,在5个 mtDNA 序列中,序列 *nad7/1-2* 的 Tajima's *D* 值、Fu and Li's *D** 值和 Fu and Li's *F** 值最大,序列 *nad2/1-2* 的 Tajima's *D* 值、Fu and Li's *D** 值和 Fu and Li's *F** 值最小,且5个 mtDNA 序列的 Tajima's *D* 值、Fu and Li's *D** 值和 Fu and Li's *F** 值均差异不显著 ($P>0.10$),符合中性进化模型。cpDNA *matK* 的 Tajima's *D* 值、Fu and Li's *D** 值和 Fu and Li's *F** 值分别为-1.627 84、-2.009 96 和-2.168 40,在 $0.05<P<0.10$ 的情况下差异不显著,符合中性进化模型。6个序列合并后,

Tajima's *D* 值、Fu and Li's *D** 值和 Fu and Li's *F** 值分别为-0.639 26、-0.796 77 和-0.858 74,差异不显著 ($P>0.10$),符合中性进化模型(表4)。

2.2 系统发育树分析

对3个甘薯栽培种及8个近缘野生种进行遗传多样性分析,11份试验材料间的遗传距离均在0.000 00~0.005 84之间,‘月光花’与‘黄色朝颜’2个品种间的遗传距离最大,为0.005 84,3个栽培种间的遗传距离为0,3个栽培种及8个近缘野生种间的平均遗传距离为0.003 26(表5)。

表4 Tajima's *D* 测验和 Fu and Li's *D*/F**测验
Table 4 Tajima's *D* test and Fu and Li's *D*/F** test

基因序列 Gene sequence	Tajima's <i>D</i>	Fu and Li's <i>D*</i>	Fu and Li's <i>F*</i>	<i>P</i>
<i>ccb203</i>	-0.321 97	-0.083 18	-0.161 10	>0.10
<i>nad2/1-2</i>	-1.128 50	-1.289 46	-1.399 19	>0.10
<i>nad2/4-5</i>	0.500 00	0.574 40	0.628 71	>0.10
<i>nad5/4-5</i>	-0.356 59	-0.514 26	-0.537 17	>0.10
<i>nad7/1-2</i>	1.018 28	1.214 66	1.312 69	>0.10
<i>matK</i>	-1.627 84	-2.009 96	-2.168 40	>0.05, < 0.10
合并Total	-0.639 26	-0.796 77	-0.858 74	>0.10

表5 11份试验材料的遗传距离¹⁾
Table 5 Genetic distance among 11 experimental materials

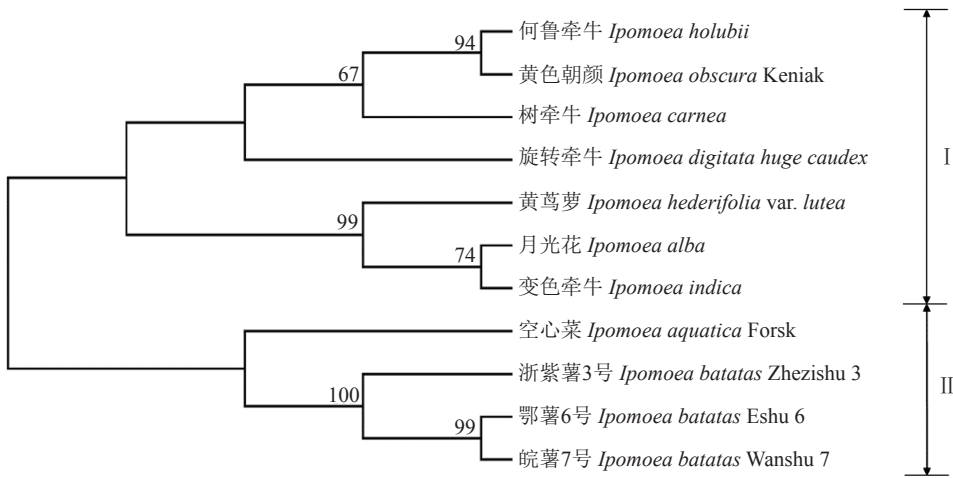
样品编号 Sample No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1										
2	0.003 47									
3	0.002 99	0.003 63								
4	0.003 78	0.001 42	0.004 42							
5	0.002 99	0.005 21	0.004 73	0.005 84						
6	0.003 15	0.001 10	0.003 78	0.000 94	0.004 89					
7	0.002 52	0.003 15	0.003 63	0.003 78	0.004 26	0.003 15				
8	0.001 89	0.003 15	0.002 68	0.004 10	0.003 63	0.003 47	0.002 52			
9	0.003 47	0.003 63	0.003 15	0.003 78	0.004 89	0.003 15	0.003 15	0.003 15		
10	0.003 47	0.003 63	0.003 15	0.003 78	0.004 89	0.003 15	0.003 15	0.003 15	0.000 00	
11	0.003 47	0.003 63	0.003 15	0.003 78	0.004 89	0.003 15	0.003 15	0.003 15	0.000 00	0.000 00

1) 1: 何鲁牵牛, 2: ‘黄茛萝’, 3: 空心菜, 4: ‘月光花’, 5: ‘黄色朝颜’, 6: 变色牵牛, 7: 旋转牵牛, 8: 树牵牛, 9: ‘浙紫薯3号’, 10: ‘鄂薯6号’, 11: ‘皖薯7号’

1) 1: *Ipomoea holubii*, 2: *Ipomoea hederifolia* var. *lutea*, 3: *Ipomoea aquatica* Forsk, 4: *Ipomoea alba*, 5: *Ipomoea obscura* Keniak, 6: *Ipomoea indica*, 7: *Ipomoea digitata* huge caudex, 8: *Ipomoea carnea*, 9: *Ipomoea batatas* ‘Zhezishu 3’, 10: *Ipomoea batatas* ‘Eshu 6’, 11: *Ipomoea batatas* ‘Wanshu 7’

基于邻接法构建甘薯栽培种及近缘野生种的系统发育进化树,可将3个甘薯栽培种及8个近缘

野生种分为2大类(I和II)(图1),第一大类包括7个近缘野生种,第二大类包括3个栽培种和1个



图中数字表示自展值百分比/%

The number in the figure indicates the bootstrap value percentage/%

图 1 邻接法构建系统发育进化树

Fig. 1 The phylogenetic tree constructed by neighbor-joining method

近缘野生种。第一大类又可分为 2 类, 何鲁牵牛、‘黄色朝颜’、树牵牛和旋转牵牛被归为一类, ‘黄茛萝’ ‘月光花’ 和变色牵牛被归为一类; 第二大类可分为 2 类, 第一类为空心菜, 第二类为‘浙紫薯 3 号’ ‘鄂薯 6 号’ 和 ‘皖薯 7 号’ (图 1)。

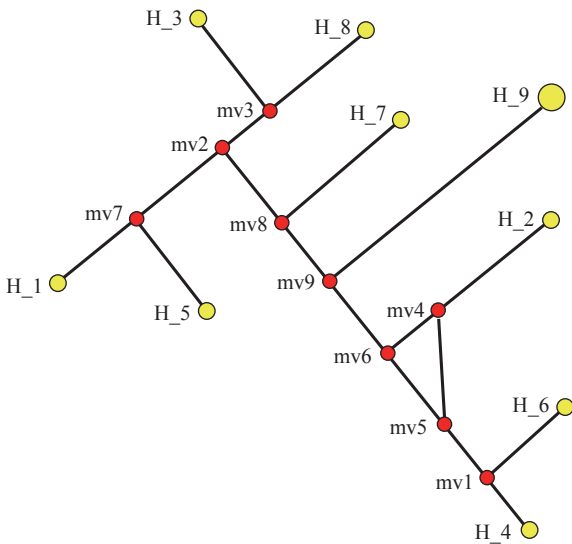
2.3 单倍型中介网络

使用软件 NetWork 中介邻接网络算法对 3 个甘薯栽培种及 8 个近缘野生种的单倍型绘制网络图, 11 份材料表现出 9 种单倍型, 图中无明显主体单倍型 (图 2)。单倍型 H₁~H₈ 分别对应何鲁牵牛、‘黄茛萝’、空心菜、‘月光花’ ‘黄色朝颜’、变色牵牛、旋转牵牛和树牵牛, 单倍型 H₉ 对

应‘紫薯 3 号’ ‘鄂薯 6 号’ 和 ‘皖薯 7 号’。单倍型之间呈线状排列, 无主体单倍型, 单倍型 H₁ 与 H₅ 有共同节点, 单倍型 H₃ 与 H₈ 有共同节点, 单倍型 H₄ 与 H₆ 有共同节点。中介邻接网络算法分析结果与邻接聚类分析结果一致, 甘薯栽培种与野生种之间存在界限。

3 讨论与结论

甘薯近缘野生种是重要的育种资源, 基于 mtDNA 和 cpDNA 序列特征对甘薯近缘野生种进行分析, 可为甘薯育种提供新的资源。序列特征分析在甘薯及近缘野生种分析中被广泛应用, 刘峥等^[27] 以及俞立璇等^[28] 使用 ITS 序列对甘薯栽培种和近缘野生种进行序列特征分析, 显示 ITS 序列可用于旋花科的系统演化关系分析, 为甘薯野生种的利用提供了理论依据。*matK* 序列是叶绿体中进化速率较快的基因之一, 存在一定程度的分化, 由于叶绿体基因组较为保守, 其进化速率远低于核基因的进化速率^[29]。低进化速率限制了 *matK* 及其他叶绿体基因在低级分类层面 (如属、亚属) 中的应用, *matK* 序列不能应用于甘薯属内间的亲缘关系研究。线粒体基因在系统学研究中应用较为广泛, 如 *nad1* 基因应用于探讨稻族 *Oryzae* 的系统发育^[30]; *nad5* 序列应用于秦艽组植物的分子系统发育分析及物种鉴定^[31]; *nad7/1-2* 序列用于分析突尼斯柑橘砧木种质资源的遗传多样性^[32]。与核基因相比, 线粒体基因如 *nad1* 序列在较高等级类群的系统发育重建中有更高的信息量, 变异水平更适于在高等级层面的系统发育重建。相较于核基因和叶绿体基因, 线粒体基因变异速率低, 结构不稳定, 但筛选出



H₁~H₉: 单倍型, mv: 可能存在的原始单倍型

H₁~H₉: Haplotype, mv: The possible original haplotype

图 2 单倍型中介邻接网络图

Fig. 2 Median-joining network for haplotypes

合适的线粒体序列片段仍能为植物的系统学研究和亲缘关系鉴定提供新的证据。在植物系统学研究中,采用 mtDNA 对甘薯近缘野生种进行分析的报道较少,通过 mtDNA 和 cpDNA 对甘薯近缘野生种进行分析,可为研究旋花科的系统演化提供新的方法和指导。

本研究选用 6 个 mtDNA 序列和 1 个 cpDNA 序列的引物在 3 个甘薯栽培种及 8 个近缘野生种中进行扩增,结果显示,在 11 个材料中,mtDNA 序列 *ccb256* 无多态性,表现出多态性的序列占比为 85.7%,表明基于 mtDNA 和 cpDNA 开发的通用引物在甘薯栽培种及近缘野生种的多态性分析中具有良好的多态性。具有多态性的 5 个 mtDNA 序列中,*nad2/1-2* 和 *nad7/1-2* 序列中的 GC 占比大于 AT 占比,*ccb203*、*nad2/4-5* 和 *nad5/4-5* 序列中的 GC 占比小于 AT 占比,表明 *nad2/1-2* 和 *nad7/1-2* 序列更为稳定。*matK* 序列的 GC 占比小于 AT 占比,*matK* 序列的核苷酸多样性高于 mtDNA 序列的,与 Yang 等^[33] 基于核基因组和叶绿体基因组分析中国橡树的试验结果基本保持一致。对 mtDNA 序列的变异位点进行分析,产生的变异位点以单一突变位点和插入/缺失突变为主,序列 *nad5/4-5* 的单一突变位点最多(10 个),序列 *nad2/4-5* 插入/缺失位点在 6 个序列中最多(63 个)。与 mtDNA 序列相比,cpDNA 序列 *matK* 的单一突变位点(23 个)比 mtDNA 序列的多,而插入/缺失位点(1 个)远少于 mtDNA 序列的。对 6 个序列的单倍型多样性进行分析,mtDNA 序列中 *nad2/1-2* 序列的单倍型数量和单倍型多样性最小(2, 0.182)。*matK* 序列的单倍型数量(9)和单倍型多样性(0.945)比 5 个 mtDNA 序列的高,表明相较于 mtDNA 序列,cpDNA 序列反映的序列特征信息更为丰富。对甘薯近缘野生种进行分析时,mtDNA 和 cpDNA 序列结合获得的结果更为准确。

中性检验(Neutrality test)是通过统计学的检验方法分析 DNA 数据,进而检验自然选择^[34]。本研究采用 Tajima's *D* 和 Fu and Li's *D*/F** 检验,结果显示基于 mtDNA 序列分析的 Tajima's *D* 值、Fu and Li's *D** 值和 Fu and Li's *F** 值均差异不显著($P>0.10$),符合中性进化模型;*matK* 序列的 Tajima's *D* 值、Fu and Li's *D** 值和 Fu and Li's *F** 在 $0.05<P<0.10$ 时差异不显著,符合中性进化模型;当 6 个序列合并后,合并序列差异不显著($P>0.10$),符合中性进化模型。中性检验的结果表明,甘薯近缘野生种在遗传进化时表现稳定,符合中性进化模型,没有出现种群扩张的情况,单倍型网络无中心再度证明甘薯近缘野生种在遗传进化时无种群扩

张的情况。本研究 3 个甘薯栽培种及 8 个近缘野生种间的遗传距离在 0.000 00~0.005 84 之间,平均遗传距离为 0.003 26,表明 3 个甘薯栽培种及 8 个近缘野生种的遗传距离小,彼此间亲缘关系近,遗传多样性低,如‘浙紫薯 3 号’‘鄂薯 6 号’和‘皖薯 7 号’之间的遗传距离为 0,亲缘关系密切。使用 5 个 mtDNA 序列和 1 个 cpDNA *matK* 序列对甘薯栽培种和近缘野生种进行分析时,栽培种之间的遗传距离为 0,栽培种与近缘野生种的遗传距离和近缘野生种之间的遗传距离在 0.000 94~0.005 84 之间,说明 mtDNA 序列和 *matK* 序列在同属种间的系统发育和种内材料的亲缘关系分析中具有一定的参考价值。使用邻接法构建 3 个栽培种及 8 个近缘野生种的系统进化树,11 个材料被分为 2 大类:7 个近缘野生种归为 I 类,3 个栽培种和空心菜归为 II 类。甘薯栽培种和近缘野生种聚类在不同组别中,表明 mtDNA 序列和 cpDNA 序列可用于甘薯栽培种和近缘野生种的关系鉴定。空心菜和 3 个甘薯栽培种归为一类,空心菜与 3 个栽培种的遗传距离一致,四者之间的遗传距离小于空心菜与‘月光花’‘黄色朝颜’、变色牵牛和旋转牵牛之间的遗传距离,大于空心菜与树牵牛之间的遗传距离,推测空心菜是旋花科植物进化的重要研究对象。系统发育树中,‘黄色朝颜’与 3 个甘薯栽培种的亲缘关系较远,遗传距离较大,‘月光花’与‘黄色朝颜’的亲缘关系较远,遗传距离较大,‘黄色朝颜’与‘月光花’可用于甘薯育种的亲本选配。

3 个甘薯栽培种及 8 个近缘野生种的 mtDNA 和 cpDNA 序列分析显示,mtDNA 序列和 cpDNA 序列可用于甘薯栽培种及近缘野生种的遗传多样性和亲缘关系研究,为旋花科植物的分类和系统发育研究提供指导,还可为甘薯种质资源的开发利用和筛选提供理论依据。

参考文献:

- [1] SHEKHAR S, MISHRA D, BURAGOHAIN A K, et al. Comparative analysis of phytochemicals and nutrient availability in two contrasting cultivars of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.)[J]. *Food Chemistry*, 2015, 173: 957-965.
- [2] MOHANRAJ R, SIVASANKAR S. Sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam): A valuable medicinal food: A review[J]. *Journal of Medicinal Food*, 2014, 17(7): 733-741.
- [3] YANG Z, ZHU P, KANG H, et al. High-throughput deep sequencing reveals the important role that microRNAs play in the salt response in sweet potato (*Ipomoea batatas* L.)[J]. *BMC Genomics*, 2020, 21(1). doi: 10.1186/s12864-020-6567-3.

- [4] 谢一芝, 郭小丁, 贾赵东, 等. 中国食用甘薯育种现状及展望[J]. *江苏农业学报*, 2018, 34(6): 1419-1424.
- [5] 胡玲, 李强, 王欣, 等. 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.
- [6] 李强, 刘庆昌, 马代夫. 甘薯近缘野生种研究利用现状及展望[J]. *分子植物育种*, 2006, 4(6S): 105-110.
- [7] 曹清河, 张安, 李鹏, 等. 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.
- [8] GARRIDO-CARDENAS J A, MESA-VALLE C, MANZANO-AGUGLIARO F. Trends in plant research using molecular markers[J]. *Planta*, 2018, 247(3): 543-557.
- [9] YANG X S, SU W J, WANG L J, et al. Molecular diversity and genetic structure of 380 sweetpotato accessions as revealed by SSR markers[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2015, 14(4): 633-641.
- [10] 苏一钧, 王娇, 戴习彬, 等. 303 份甘薯地方种 SSR 遗传多样性与群体结构分析[J]. *植物遗传资源学报*, 2018, 19(2): 243-251.
- [11] 季志仙, 王美兴, 范宏环, 等. 基于 ISSR 指纹的甘薯食用品种的遗传多样性分析[J]. *核农学报*, 2014, 28(7): 1197-1202.
- [12] 王崇, 王连军, 苏文瑾, 等. 基于 cpSSR 标记的甘薯品种亲缘关系及遗传多样性分析[J]. *分子植物育种*, 2020, 18(5): 1687-1696.
- [13] LEE K J, LEE G A, LEE J R, et al. Genetic diversity of sweet potato (*Ipomoea batatas* L. Lam) germplasms collected worldwide using chloroplast SSR markers[J]. *Agromony*, 2019, 9(11): 725-740.
- [14] GUALBERTO J M, NEWTON K J. Plant mitochondrial genomes: Dynamics and mechanisms of mutation[M]//MERCHANT S S. Annual Review of Plant Biology: Vol 68. Palo alto: Annual Reviews. 2017: 225-252.
- [15] PELLETIER G, BUDAR F. The molecular biology of cytoplasmically inherited male sterility and prospects for its engineering[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2007, 18(2): 121-125.
- [16] LILLY J W, BARTOSZEWSKI G, MALEPSZY S, et al. A major deletion in the cucumber mitochondrial genome sorts with the MSC phenotype[J]. *Current Genetics*, 2001, 40(2): 144-151.
- [17] QIN Y J, BUAHOM N, KROSCHE M N, et al. Genetic diversity and population structure in *Bactrocera correcta* (Diptera: Tephritidae) inferred from mtDNA *cox1* and microsatellite markers[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 38476. doi: 10.1038/srep38476.
- [18] BOUILLÉ M, SENNEVILLE S, BOUSQUET J. Discordant mtDNA and cpDNA phylogenies indicate geographic speciation and reticulation as driving factors for the diversification of the genus *Picea*[J]. *Tree Genetics & Genomes*, 2011, 7(3): 469-484.
- [19] GODBOUT J, JARAMILLO-CORREA J P, BEAULIEU J, et al. A mitochondrial DNA minisatellite reveals the postglacial history of jack pine (*Pinus banksiana*), a broad-range North American conifer[J]. *Molecular Ecology*, 2005, 14(11): 3497-3512.
- [20] HU D, LUO Z. Polymorphisms of amplified mitochondrial DNA non-coding regions in *Diospyros* spp.[J]. *Scientia Horticulturae*, 2006, 109(3): 275-281.
- [21] 马丽, 周玉亮, 郝兆祥, 等. 石榴种质资源的 *matK* 基因序列分析[J]. *分子植物育种*, 2020, 18(16): 5274-5279.
- [22] DUMINIL J, PEMONGE M H, PETIT R J. A set of 35 consensus primer pairs amplifying genes and introns of plant mitochondrial DNA[J]. *Molecular Ecology Notes*, 2002, 2(4): 428-430.
- [23] DUMOLIN-LAPEGUE S, PEMONGE M H, PETIT R J. An enlarged set of consensus primers for the study of organelle DNA in plants[J]. *Molecular Ecology*, 1997, 6(4): 393-397.
- [24] 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): e32057.
- [25] KUMAR S, STECHER G, LI M, et al. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, 35(6): 1547-1549.
- [26] ROZAS J, FERRER-MATA A, SÁNCHEZ-DELBARRIO J C, et al. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2017, 34(12): 3299-3302.
- [27] 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.
- [28] 俞立璇, 刘美艳, 曹清河, 等. 栽培种甘薯及其近缘野生种 nrDNA ITS 序列分析[J]. *植物科学学报*, 2014, 32(1): 40-49.
- [29] JIN D P, LEE J H, XU B, et al. Phylogeography of East Asian *Lespedeza buergeri* (Fabaceae) based on chloroplast and nuclear ribosomal DNA sequence variations[J]. *Journal of Plant Research*, 2016, 129(5): 793-805.
- [30] 郭亚龙, 葛颂. 线粒体 *nad1* 基因内含子在稻族系统学研究中的价值: 兼论 *Porteresia* 的系统位置[J]. *植物分类学报*, 2004, 42(4): 333-344.
- [31] 陆佳妮, 赵志礼, 倪梁红, 等. 线粒体 *nad1/b-c* 及 *nad5/d-e* 在秦艽组植物中物种鉴定意义的评价[J]. *药物学报*, 2019, 54(1): 166-172.
- [32] SNOUSSI H, DUVAL M F, GARCIA-LOR A, et al. Assessment of the genetic diversity of the Tunisian citrus rootstock germplasm[J]. *BMC Genetics*, 2012: 13. doi: 10.1186/1471-2156-13-16.
- [33] YANG J, VÁZQUEZ L, CHEN X D, et al. Development of chloroplast and nuclear DNA markers for Chinese Oaks (*Quercus* Subgenus *Quercus*) and assessment of their utility as DNA barcodes[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017: 8. doi: 10.3389/fpls.2017.00816.
- [34] KORNELIUSSEN T S, MOLTKE I, ALBRECHTSEN A, et al. Calculation of Tajima's *D* and other neutrality test statistics from low depth next-generation sequencing data[J]. *BMC Bioinformatics*, 2013: 14. doi: 10.1186/1471-2105-14-289.