

薯蓣属植物人工杂交后代的检测

吴宝成^①, 杭悦宇^①, 周义峰, 王筱璐, 赵亚美, 韦阳连

(江苏省·中国科学院植物研究所(南京中山植物园), 江苏 南京 210014)

摘要:以湖北武当山的盾叶薯蓣(*Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright)为主要亲本,与重庆金佛山的盾叶薯蓣、小花盾叶薯蓣(*D. parviflora* C. T. Ting)及黄独(*D. bulbifera* L.)进行种内和种间杂交,并获得部分杂交组合的 F_1 代植株。将 F_0 代种子与 F_1 代植株进行结实率及种子萌发率比较,并与亲本进行过氧化物酶(POD)、超氧化物歧化酶(SOD)和酯酶(EST)同工酶比较。结果表明,不同亲本及其杂交后代的结实率、种子萌发率和实生苗存活率均存在明显差异;亲本和 F_1 代的同工酶谱较丰富,部分杂种与亲本的相似度较高,并出现各自的特征酶带。运用同工酶技术可以鉴别杂种的真伪。

关键词:薯蓣属; 杂交育种; 同工酶; 杂种鉴定

中图分类号: Q949.71+8.27 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0978(2007)04-0013-05

Identification of hybrid generation among *Dioscorea* L. species WU Bao-cheng, HANG Yue-yu^①, ZHOU Yi-feng, WANG Xiao-lu, ZHAO Ya-mei, WEI Yang-lian (Institute of Botany, Jiangsu Province and the Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2007, 16 (4): 13-17

Abstract: Intraspecific and interspecific hybridizations between *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright from Wudangshan of Hubei Province and *D. zingiberensis* from Jinfoshan of Chongqing, *D. parviflora* C. T. Ting and *D. bulbifera* L. were undertaken. Plants of F_1 hybrid were generated from some crosses. F_0 seeds and F_1 hybrid plants were compared with their parents in setting percentage and seed germination rate. And POD, SOD and EST isozyme zymograms of F_1 hybrids and their parents were compared, too. The results showed that setting percentage, seed germination rate and seedling survival rate had significant difference among different parents and their F_1 hybrids. The band number of isozyme zymograms of parents and their F_1 hybrids were abundant, and isozyme zymograms of some hybrids had more similarity to those of parents, meanwhile some F_1 hybrids had their own characteristic bands. It is suggested that the isozyme technique can be apply to identify F_1 hybrid plants and eliminate pseudo hybrid plants.

Key words: *Dioscorea* L.; cross breeding; isozyme; hybrid identification

盾叶薯蓣(*Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright)又名黄姜、苦良姜,为薯蓣属(*Dioscorea* L.)根状茎组(Sect. *Stenophora* Uline)多年生藤本植物,是中国特有植物之一,其根茎中的薯蓣皂苷元(diosgenin)可合成激素类药物,不但具有麻醉、消炎及镇痛等作用,还是生产治疗心血管疾病和避孕药的重要原料。盾叶薯蓣单株薯蓣皂苷元含量最高达16.15%,超过国外高含量种类,如小穗花薯蓣(*D. spiculiflora* Hemsley)和森林薯蓣(*D. sylvatica* Eckl.)等,是目前已知的单株薯蓣皂苷元含量最高的种类^[1]。传粉生物学研究结果表明,套袋后,盾叶薯蓣雌株可结实^[2]。

近20年来,随着对薯蓣皂苷元需求量的增加,

盾叶薯蓣被大量采挖,导致其野生资源遭到严重破坏。20世纪60年代末,盾叶薯蓣总储量约 6.0×10^4 t;而2001年,主产区秦巴-武当山地区的野生储量仅约 0.5×10^4 t^[3]。目前,国内盾叶薯蓣栽培面积约 7.0×10^4 hm²,主要集中在陕西及湖北等省。人工栽培的盾叶薯蓣主要靠无性繁殖,种质退化严重,薯蓣皂苷元含量逐年下降,一般仅约1%,严重影响薯蓣皂苷元的生产和应用。

收稿日期: 2007-03-12

基金项目: 江苏省农业科技攻关项目(BE2001356)

作者简介: 吴宝成(1980-),男,江苏淮安人,硕士,研究实习员,主要从事药用植物种质资源研究工作。

^① 通讯作者 E-mail: hangyueyu@21cn.com

小花盾叶薯蓣(*D. parviflora* C. H. Ting)是野生薯蓣皂苷元的资源植物之一,是盾叶薯蓣在云南的替代分布种,两者形态十分相似,小花盾叶薯蓣含薯蓣皂苷元1%~2%;黄独(*D. bulbifera* L.)属基生翅组(Sect. *Opsophyton* Uline)种类,为世界广布种,中国黄河以南各省区均有分布,蕴藏量很大^[4],但不含薯蓣皂苷元。利用薯蓣皂苷元含量较高的盾叶薯蓣进行种间杂交,对探索薯蓣属种类间杂交的可行性、培育具有含量和分布优势的种质,以及扩大薯蓣皂苷元的植物资源具有重要的理论与实践意义。

近年来,运用组织培养和多倍体育种技术筛选高含量盾叶薯蓣的报道较多^[5-7],但由于薯蓣属旧大陆种的种间杂交不易成功^[8],因此未见有关薯蓣属种间杂交的成功报道。从2004年开始,笔者以盾叶薯蓣、小花盾叶薯蓣和黄独为亲本进行种内和种间杂交,并对获得的杂交子代进行比较。由于在植物育种过程中,同工酶标记技术已成功用于杂种鉴定和比较^[9-11],因此,作者对亲本和F₁代同工酶酶谱差异进行了比较和分析,以为薯蓣属植物的杂交育种提供一定的实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料均栽培于南京中山植物园薯蓣种质圃内,其中盾叶薯蓣来源于湖北武当山和重庆金佛山;小花盾叶薯蓣采自云南丽江,黄独来源于云南景洪,经杭悦宇研究员鉴定,凭证标本存于江苏省·中国科学院植物研究所。

1.2 方法

1.2.1 杂交方法 于2004年6月至8月,用人工套袋法将选定的雌花于开花前套袋。在雌花完全开放的3~5 d内进行授粉。授粉方法参照 Abraham等^[12]的铅笔法(pencil method)进行。实验设6个杂交组合,分别为盾叶薯蓣(湖北武当山)×盾叶薯蓣(重庆金佛山)正反交,盾叶薯蓣(湖北武当山)×小花盾叶薯蓣正反交,盾叶薯蓣(湖北武当山)×黄独正反交。分别对授粉后的结实特性、F₀代种子的萌发情况及F₁代实生苗的生长情况进行观察和记录。

1.2.2 同工酶酶谱分析 于2005年春,将杂交种子播种于薯蓣种质圃内,进行常规田间管理。待种子萌发并长成幼苗后,取生长状态一致的中上部叶片进行同工酶分析。称取叶片0.4 g,用液氮研磨,然后加入0.5 mL提取缓冲液(含质量分数5%的PVP、2 mmol·L⁻¹ Vc及30 mmol·L⁻¹ β-巯基乙醇),混匀,4 ℃、12 000 r·min⁻¹离心30 min,取上清液。按体积比3:1的比例在上清液中加入质量分数40%的蔗糖溶液,混合待用。

采用聚丙烯酰胺凝胶进行垂直板电泳,分离胶与浓缩胶的质量分数分别为7.5%和4.5%,点样量25 μL,凝胶缓冲液和电极缓冲液的配制均根据何忠效^[13]和王中仁^[14]的方法进行。4 ℃条件下电泳,初始电压100 V,当溴酚蓝前沿到达分离胶时,将电压调至200 V,稳压条件下继续电泳,当溴酚蓝前沿距分离胶下缘约1 cm时停止电泳。

过氧化物酶采用联苯胺-H₂O₂法染色^[13];超氧化物歧化酶采用NBT法^[13]显色;酯酶染色参照文献[14]的方法进行。凝胶染色后,在胶片观察灯下拍照,记录各条带的迁移率(Rf值),并根据Rf值和酶谱强弱绘制模式图,保存胶片。

2 结果和分析

2.1 F₀代植株的结实状况分析

以盾叶薯蓣、小花盾叶薯蓣和黄独为亲本,杂交后F₀代植株的结实情况见表1。由表1可见,在授粉花朵数大致相同的情况下,盾叶薯蓣(湖北武当山)和盾叶薯蓣(重庆金佛山)种内杂交组合的结果数、种子数和结实率均较高;以黄独为母本、盾叶薯蓣为父本的杂交组合结实率极低;以盾叶薯蓣为母本的杂交组合结实率普遍高于其反交组合。研究还发现,盾叶薯蓣种内杂交组合的种子饱满度较高。

2.2 F₁代实生苗的生长情况

以盾叶薯蓣、小花盾叶薯蓣和黄独为亲本的6个杂交组合后代的种子萌发情况及幼苗生长情况见表2。由表2可见,除小花盾叶薯蓣×盾叶薯蓣和黄独×盾叶薯蓣杂交后获得的种子很少,不能萌发外,其他杂交组合杂交后获得的种子均能萌发,但种子萌发率差异较大,以盾叶薯蓣(湖北武当山)和盾叶薯蓣(重庆金佛山)种内杂交组合的种子萌发

率最高,达 30.91%。所有萌发种子发育成的幼苗均能存活。观察发现,各杂交组合实生苗的形态特征与母本相似,只有盾叶薯蓣×小花盾叶薯蓣的 1

株杂种苗的叶形态兼有父本和母本的特征,即叶片上有类似于盾叶薯蓣的花斑,叶片形状类似于小花盾叶薯蓣的卵圆形。

表1 盾叶薯蓣、小花盾叶薯蓣和黄独的杂交实验结果

Table 1 Results of cross experiments among *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright, *D. parviflora* C. T. Ting and *D. bulbifera* L.

杂交组合 ¹⁾ Hybridized combination ¹⁾ (♀×♂)	授粉花序数 Number of pollinated inflorescence	授粉花数 Number of pollinated flower	结果数 Fruit number	结实率/% Setting percentage	种子数 Seed number	理论种子数 Expected seed number
DW×DJ	30	78	15	19.230 0	69	90
DJ×DW	27	88	14	15.910 0	72	84
DW×XL	27	72	8	11.110 0	26	48
XL×DW	29	103	2	1.940 0	3	12
DW×HJ	35	96	10	10.420 0	33	60
HJ×DW	69	3 451	1	0.002 9	3	6

¹⁾DW: 来源于湖北武当山的盾叶薯蓣 *D. zingiberensis* C. H. Wright from Wudangshan of Hubei Province; DJ: 来源于重庆金佛山的盾叶薯蓣 *D. zingiberensis* from Jinfoshan of Chongqing; XL: 小花盾叶薯蓣 *D. parviflora* C. T. Ting; HJ: 黄独 *D. bulbifera* L.

表2 盾叶薯蓣、小花盾叶薯蓣和黄独杂交后代种子萌发及幼苗生长情况

Table 2 Status of seed germination and seedling growth of hybrid generation among *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright, *D. parviflora* C. T. Ting and *D. bulbifera* L.

杂交组合 ¹⁾ Hybridized combination ¹⁾ (♀×♂)	播种数 Number of sowing seed	种子萌发率/% Seed germination rate	幼苗存活数 Number of survival seedling
DW×DJ	55	30.91	17
DJ×DW	55	1.82	1
DW×XL	20	10.00	2
XL×DW	3	0.00	0
DW×HJ	18	11.11	2
HJ×DW	1	0.00	0

¹⁾DW: 来源于湖北武当山的盾叶薯蓣 *D. zingiberensis* C. H. Wright from Wudangshan of Hubei Province; DJ: 来源于重庆金佛山的盾叶薯蓣 *D. zingiberensis* from Jinfoshan of Chongqing; XL: 小花盾叶薯蓣 *D. parviflora* C. T. Ting; HJ: 黄独 *D. bulbifera* L.

2.3 亲本和杂种间的同工酶谱比较

2.3.1 盾叶薯蓣(湖北武当山)×盾叶薯蓣(重庆金佛山) 湖北武当山和重庆金佛山的盾叶薯蓣及其 17 株杂种的过氧化物酶(POD)同工酶谱见图 1。结果显示,亲本有 2 条共同酶带 a 和 e, Rf 值分别为 0.13 和 0.35;母本盾叶薯蓣(湖北武当山)具有特征酶带 b, Rf 值 0.21;父本盾叶薯蓣(重庆金佛山)具有特征酶带 c, Rf 值 0.22。在 17 个杂种中,1 号杂种拥有父本的特征酶带 c,为偏父本类型;14~17 号杂种除拥有父本特征酶带 c 外,还出现新酶带,即 f 和 g, Rf 值分别为 0.46 和 0.50,其中 14 号杂种缺失 a 和 e 酶带;12 号杂种仅有父母本的共有酶带 a 和 e,为缺失型;其他杂种(2~11 号和 13 号)除拥有父母

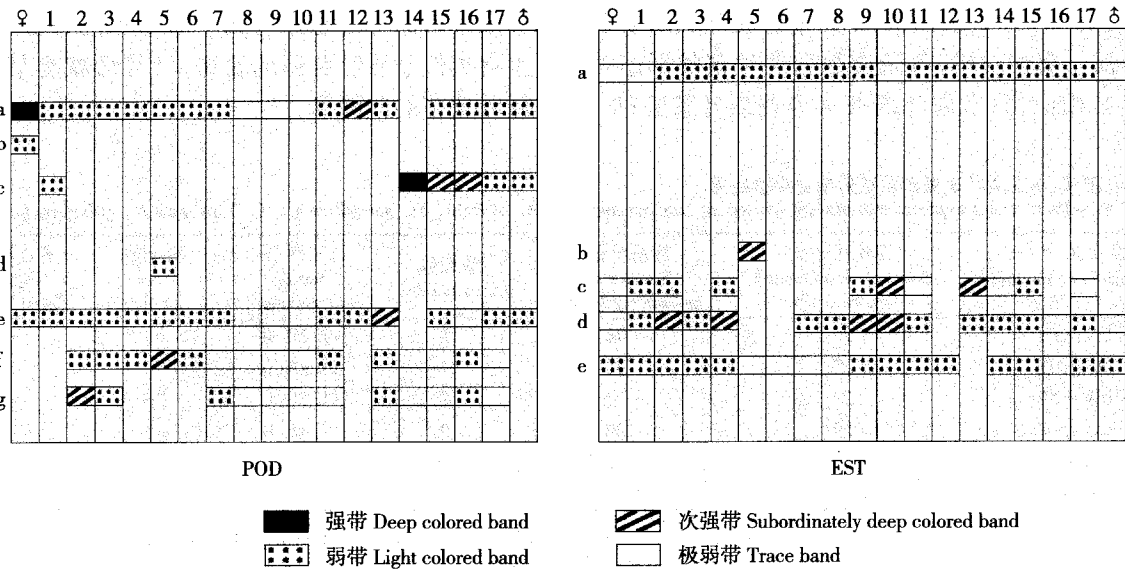
本的共有酶带外,还出现新酶带 d、f 和 g,为杂种酶型。

研究发现,17 株杂种与其亲本(湖北武当山和重庆金佛山的盾叶薯蓣)的超氧化物歧化酶(SOD)同工酶谱完全一致,都具有 Rf 值为 0.09、0.34、0.38 和 0.89 的酶带。因此,不能用于杂种鉴定。

酯酶(EST)同工酶分析结果表明(图 1),亲本有 3 条共同酶带 a、d 和 e, Rf 值分别为 0.09、0.47 和 0.51;母本盾叶薯蓣(湖北武当山)具有特征酶带 c, Rf 值 0.43;1、2、4、9、10、11、14、15 和 17 号杂种拥有母本的 4 条酶带,为偏母本类型,较难判断是否为真杂种;3、5、6、7、8、12 和 13 号杂种缺失 c、d 或 e 酶带中的 1 条或 2 条,为缺失类型,其中 5 号杂种出现 1 条新酶带 b, Rf 值 0.29。

2.3.2 盾叶薯蓣(重庆金佛山)×盾叶薯蓣(湖北武当山) 重庆金佛山和湖北武当山的盾叶薯蓣及其 1 株杂种的 POD 同工酶谱分析结果显示,亲本共有 Rf 值 0.12 的酶带, Rf 值 0.21 和 0.35 的酶带为父本特征酶带, Rf 值 0.41 和 0.45 的酶带为母本特征酶带,亲本的酶带差异比较显著。杂种兼有父本和母本的特征酶带,但更接近母本(来源于重庆金佛山的盾叶薯蓣),为偏母本类型;同时,杂种与母本的共有酶带(Rf 值 0.41)较母本染色深,为增强型。

SOD 同工酶谱分析结果显示,亲本具有 4 条共同酶带, Rf 值分别为 0.09、0.34、0.38 和 0.89,其中 Rf 值分别为 0.34 和 0.89 的酶带仅染色深浅有差异;杂种具有大部分特征酶带,仅缺失 Rf 值



♀: 来源于湖北武当山的盾叶薯蓣 *D. zingiberensis* C. H. Wright from Wudangshan of Hubei Province; ♂: 来源于重庆金佛山的盾叶薯蓣 *D. zingiberensis* from Jinfoshan of Chongqing; 1-17: 杂种 Hybrids.

图1 亲本盾叶薯蓣及其17个杂种的POD和EST同工酶酶谱
Fig. 1 POD and EST isozyme zymograms of parents and seventeen F₁ hybrids of *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright

0.89的酶带,为缺失型。

EST同工酶酶谱显示,亲本具有3条共同酶带,Rf值分别为0.09、0.40和0.47,母本比父本多1条Rf值0.56的酶带;杂种具有父本的全部特征酶带,且部分酶带染色较深。

2.3.3 盾叶薯蓣×小花盾叶薯蓣 盾叶薯蓣和小花盾叶薯蓣及其2株杂种的POD同工酶酶谱显示,亲本共有Rf值0.35的酶带,Rf值0.12的酶带为父本特征酶带,Rf值0.13和0.21的酶带为母本特征酶带。杂种与母本相同的酶带染色较淡,1号和2号杂种同时具有Rf值0.12的父本特征酶带和Rf值0.21的母本特征酶带,1号杂种为完全互补类型。

SOD同工酶酶谱显示,除父母本共有的2条酶带外,母本还有Rf值0.09和0.34的2条特征酶带,父本具有Rf值0.47和0.67的2条特征酶带。1号杂种具有父本的特征酶带(Rf值0.47和0.67)。

EST同工酶酶谱(另1株植株瘦小,未做检测)显示,亲本无共同酶带,1号杂种兼有父本(Rf值0.29)和母本(Rf值0.09和0.41)的特征酶带,为互补类型。

反交组合(小花盾叶薯蓣×盾叶薯蓣)未得到杂种后代的成活植株,因此未进行同工酶酶谱分析。

2.3.4 盾叶薯蓣×黄独 亲本盾叶薯蓣和黄独及2株杂种的POD、SOD以及EST同工酶酶谱显示,2个

亲本的同工酶酶谱差异明显,父本酶带染色较深,说明酶活性较强;杂种无父本特征酶带,而与母本相似,2个杂种均有酶带的增加或缺失。

反交组合(黄独×盾叶薯蓣)未得到杂种后代的成活植株,因此未进行同工酶酶谱分析。

根据杂种与亲本的同工酶酶谱,已鉴定出盾叶薯蓣(湖北武当山)和盾叶薯蓣(重庆金佛山)杂交后代的1、14、15、16和17号,盾叶薯蓣和小花盾叶薯蓣杂交后代的1号和2号,盾叶薯蓣(重庆金佛山)和盾叶薯蓣(湖北武当山)的1号杂种后代均为真杂种,分别占存活杂种植株的29.41%、100.00%和100.00%。

由同工酶酶谱可以看出,与各自父母亲本相比,杂交后代具有更多的酶谱类型,有些杂种还存在缺失和新增酶带的现象。在盾叶薯蓣(湖北武当山)和盾叶薯蓣(重庆金佛山)及其杂种后代的POD同工酶酶谱中,母本Rf值为0.13的酶带染色最深,表明酶活性较高;14号杂种Rf值为0.22的酶带染色较深,酶活性较高;父本及其他杂种的酶带染色均较浅,酶活性较低。EST同工酶酶谱中,亲本及杂种后代的酶带染色均不深,未出现酶活性较高的酶带,4个杂交组合的酶谱情况基本相似。盾叶薯蓣×黄独杂交获得的2个杂种的POD、EST和SOD同工酶酶谱更接近于母本,但无法确定是否为真杂种。

3 讨 论

在研究物种亲缘关系以及由进化导致的分化过程中,薯蓣属植物的天然杂交或人工杂交具有重要的生物系统学价值^[8]。研究发现,盾叶薯蓣(湖北武当山)×盾叶薯蓣(重庆金佛山)及其反交后代的结实率相近,分别为19.23%和15.91%,但 F_0 代种子的萌发率差异较大,正交组合的种子萌发率(30.91%)远大于反交组合(1.82%),说明盾叶薯蓣种内不同居群正反杂交结果存在较大差异。在中国,盾叶薯蓣以长江为界分为南北两大居群^[15],居群间遗传差异较大。Martin等^[8]认为,新大陆种间杂交容易成功,而新大陆种与旧大陆种及旧大陆种的种间杂交均不易成功。裴鉴等^[16]根据地理分布、叶形、花大小和蒴果长宽比例等将同属于旧大陆种的盾叶薯蓣和小花盾叶薯蓣定为2个不同种。本实验中,盾叶薯蓣×小花盾叶薯蓣及其反交组合的杂交结实率分别为11.11%和1.94%,同时其反交组合并未得到存活植株,说明盾叶薯蓣与小花盾叶薯蓣的亲缘关系较远,虽然获得了同时具有盾叶薯蓣和小花盾叶薯蓣特征的杂交后代,但这2个种间仍存在较大的生殖隔离,从杂交亲和性方面支持裴鉴等^[16]对这2个种所做的分类处理。以盾叶薯蓣为母本与黄独杂交后的结实率为10.42%,但其反交组合结实率极低(0.0029%),同时没有得到存活的杂种后代,因而黄独与盾叶薯蓣具有更远的亲缘关系。

本研究小组曾在2001年进行了盾叶薯蓣×穿龙薯蓣(*D. nipponica* Makino)及盾叶薯蓣×山萆薢(*D. tokoro* Makino)的杂交研究,发现这2个组合能产生杂交种子,而在盾叶薯蓣×山药(*D. polystachya* Turcz.)的杂交试验中未获得杂交种子(未发表),从而验证了亲缘关系远近与杂交成功与否的关系。

同工酶标记技术在薯蓣属植物系统分类^[17]及杂交后代亲缘关系研究^[18]等方面已得到一定的运用。结合表1和表2可以看出,虽然通过人工杂交的方式较难得到薯蓣属植物真杂种后代,但仍可获得成功,将得到的杂种辅之一定的胚培养技术还可获得成熟胚,以提高育种效率^[19],这对薯蓣属植物亲缘关系及其系统进化关系研究具有重要意义。另外,薯蓣属植物人工杂交也是获得高生物量、高薯蓣

皂苷元含量及抗病虫害新品种的可行途径之一。

参考文献:

- [1] 丁志遵,唐世蓉,秦慧贞,等. 甾体激素药源植物[M]. 北京: 科学出版社, 1983. 31-32.
- [2] 黄涛,张友德,张君芝,等. 黄姜种内染色体数目的变异[J]. 华中农业大学学报, 2002, 21(2): 158-160.
- [3] 袁晓颖,祖元刚,于景华. 野生盾叶薯蓣(*Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright)资源储量精度估算[J]. 植物研究, 2003, 23(1): 103-105.
- [4] Ding Z Z, Gilbert M G. Flora of China (Vol. 24) [M]. Beijing: Science Press, St. Louis: MBG Press, 2000. 276-296.
- [5] 王志安,王日照. 运用组织培养技术筛选盾叶薯蓣新品种[J]. 中草药, 2002, 33(4): 361-363.
- [6] 任建伟,白云,郭秋月,等. 盾叶薯蓣悬浮培养细胞固定化的初步研究[J]. 中国中药杂志, 1994, 19(9): 529-531.
- [7] 李运合,胡春根,姚家玲,等. 盾叶薯蓣四倍体诱导的研究[J]. 中草药, 2005, 36(3): 434-438.
- [8] Martin F W, Cabanillas E. The tubers, saponinins, and virus resistance of *Dioscorea* species hybrids[J]. American Journal of Botany, 1966, 53(4): 350-358.
- [9] 铁军,金山,白海艳,等. 元江芦荟与皂质芦荟的杂交育种及POD同工酶比较[J]. 云南植物研究, 2005, 27(3): 288-294.
- [10] 柳李旺,龚义勤,汪隆植,等. 栽培茄与红茄(*Solanum integrifolium*)种间杂交及其杂种的特性分析[J]. 南京农业大学学报, 2004, 27(1): 6-10.
- [11] 黄苏珍,顾烟,贺晋安. 鸢尾属(*Iris* L.)植物的杂交育种及其同工酶分析[J]. 植物资源与环境, 1996, 5(4): 38-41.
- [12] Abraham K, Nair S G. Floral biology and artificial pollination in *Dioscorea alata* [J]. Euphytica, 1990, 48: 45-51.
- [13] 何忠效,张树政. 电泳[M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- [14] 王忠仁. 植物等位酶分析[M]. 北京: 科学出版社, 1996.
- [15] 黄春洪,杭悦宇,周义锋,等. 我国盾叶薯蓣居群遗传结构分析[J]. 云南植物研究, 2003, 25(6): 641-647.
- [16] 裴鉴,丁志遵,秦慧贞,等. 中国薯蓣属根状茎组系统分类的初步研究[J]. 植物分类学报, 1979, 17(3): 61-71.
- [17] 凌萍萍. 薯蓣属(*Dioscorea* L.)植物的过氧化物同工酶及其在分类上的意义[A]. 南京中山植物园研究论文集编辑组. 南京中山植物园研究论文集(1984—1985)[C]. 南京: 江苏科学技术出版社, 1986. 19-24.
- [18] Zoundjhepon J, Hamon S, Tio-Touré B, et al. First controlled progenies checked by isozymic markers in cultivated yams *Dioscorea cayenensis-rotundata* [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1994, 88: 1011-1016.
- [19] Asano Y, Imagawa M. Hybrid seed formation among *Dioscorea opposita* Thunb. cvs. Nagaimo, Ichimoimo, Tsukuneimo, and *Dioscorea japonica* Thunb. [J]. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 1999, 68(3): 591-597.