

应用 RAPD 标记检测淮山种质资源的遗传多样性

蔡锦玲, 凌永胜, 林文磊, 黄枝英 (泉州市农业科学研究所, 福建晋江 362212)

摘要 采用 RAPD 标记对 7 份德化淮山种质进行遗传多态性和遗传距离分析, 并构建聚类图。从 63 个 RAPD 引物中筛出 31 个多态性较好的组合, 扩增得到了 156 个多态性标记。结果表明, 7 份淮山种质依据遗传距离可分为 2 类, 组间的遗传距离为 0.32, 其中, 大铭薯、泉淮 1513 和泉淮 1547 的亲缘关系较近, 组内的平均遗传距离为 0.21, 另一类组内的平均遗传距离为 0.44。对照田间表型可见, 聚类结果相近于传统分类结果。利用 RAPD 标记能有效地分析淮山的遗传多样性, 对杂交优势的利用具有较大的指导意义。

关键词 淮山; 种质资源; RAPD; 遗传多样性; 聚类分析

中图分类号 S632.1 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2019)12-0120-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2019.12.032



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Analyzing the Genetic Diversity of *Dioscorea opposita* Thunb. Germplasm Resources by RAPD Markers

CAI Jin-ling, LING Yong-sheng, LIN Wen-lei et al (Quanzhou Institute of Agricultural Science, Jinjiang, Fujian 362212)

Abstract To analyze the genetic polymorphism and genetic distance of 7 Dehua *Dioscorea opposita* germplasm by RAPD markers, and build the cluster diagram, 31 combinations with good polymorphism were screened out from 63 RAPD primers, and 156 polymorphic markers were amplified. The results showed that 7 *D. opposita* germplasms could be divided into two groups according to genetic distance, and the genetic distance between groups was 0.32. Among them, Damingshu, Quanhui 1513 and Quanhui 1547 were closely related, with an average genetic distance of 0.21 in the group, the mean genetic distance in the other group was 0.44. Compared with the field phenotype, the clustering results were similar to the traditional classification results. The genetic diversity of *D. opposita* can be effectively analyzed by RAPD markers, which is of great guiding significance for the utilization of hybridization.

Key words *Dioscorea opposita* Thunb.; Germplasm resources; RAPD; Genetic diversity; Cluster analysis

淮山属于薯蓣科植物薯蓣(*Dioscorea opposita* Thunb.)的块状根茎, 为缠绕性藤本植物^[1], 是集医用、养生、保健、食用、饲用于一身的一种高效率经济作物, 其肉质鲜美, 风味特别, 具有滋补脾胃肺肾, 增强人体免疫能力, 抑制肿瘤细胞生长, 抗氧化活性等作用^[2]。淮山在我国的栽培历史已有 2 000 余年, 原产于我国沿海地区及东南亚一带, 现今在全国各地均有种植^[3]。由于其栽培历史长、地域广, 在栽培生产和销售市场上一直存在同名异种和同种异名的状况, 使得淮山种质资源的推广与开发更为艰难。目前国内尚未统一淮山“种”以下第一阶梯的分类标准, 因此淮山种质资源的鉴别不仅有利于其开发利用, 而且可为遗传育种提供理论支撑。

近年来, DNA 分子标记技术相继出现, 如 RAPD、RFLP、SSR 以及 SNP 等, 其中随机扩增多态性 DNA 标记 RAPD (random amplified polymorphic DNA) 具有操作方便和多态性检测率高等优势, 被广泛应用于材料鉴定、系谱亲缘及进化关系的研究^[4]。如李明军等^[5]优化了山药基因组 RAPD 分子标记技术方案; 华树妹等^[6]采用 RAPD 分子标记分析了福建省 34 份山药遗传多样性; 黄春洪等^[7]使用 RAPD 分子标记技术对国内 11 个盾叶薯蓣居群的遗传多态性进行了研究; 同时国外也报道了利用 RAPD 分子标记技术构建山药的遗传图谱^[8]。笔者拟用 RAPD 分子标记研究分析 7 个淮山种质资源的遗传多样性, 以期对淮山遗传育种和杂种优势的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 选择来自德化的 7 份淮山种质资源为供试材料, 其中德化本土品种 2 个(下涌薯、大铭薯), 新品系 5 个(泉淮红皮白肉、泉淮 1515、泉淮 1517、泉淮 1513、泉淮 1547)。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取。参照 Saghai-Maroo 等^[9]方法, 采用 CTAB 小样法提取山药幼叶基因组总 DNA。

1.2.2 PCR 反应体系。RAPD 引物委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 共合成了 63 个引物。反应体系参考华树妹等^[6]的优化体系进行。采用 20 μ L PCR 体系: 模板 DNA (20 ng/ μ L) 1 μ L, 10 \times Easy Taq Buffer 2 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 0.4 μ L, 引物 (10 μ mol/L) 0.2 μ L, Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μ L) 0.3 μ L, 加 ddH₂O 至 20 μ L。PCR 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 37 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 40 个循环; 循环结束后在 72 $^{\circ}$ C 的反应条件下延伸 10 min。反应终止后 4 $^{\circ}$ C 保存, PCR 扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.2.3 标记采集。统计各样本的 RAPD 扩增条带(有带读 1, 没有带读 0, 只读有多态性的标记)。

1.2.4 数据处理。2 个样本 X 与 Y 之间遗传距离的计算参照 Nei 等^[10]提供的计算公式: $GD_{xy} = 1 - 2N_{xy} / (N_x + N_y)$, 其中, N_{xy} 为样本 X 与 Y 所共有的带; N_x 为 X 样本所有的带; N_y 为 Y 样本所有的带^[10]。组内平均遗传距离取组内材料间遗传距离的平均值; 组间平均遗传距离取不同组间材料遗传距离的平均值; 材料平均遗传距离为某一材料与其他所有供试材料遗传距离的平均值。用非加权平均法(UPGMA)构建材料间的聚类图。遗传距离的计算和聚类图的构建采用 R 软件包^[11]。

基金项目 泉州市科研专项(2018N053); 福建省科技计划项目(2018N0051)。

作者简介 蔡锦玲(1989—), 女, 福建晋江人, 研究实习员, 从事淮山、番茄育种与栽培技术研究。

收稿日期 2019-02-27; **修回日期** 2019-03-13

2 结果与分析

2.1 淮山种质资源分析评价 调查显示, 泉淮 1517、下涌薯、泉淮 1515 和泉淮红皮白肉长势旺盛, 茎蔓棱翼四棱形, 叶片较大、厚纸质, 叶柄长, 叶基出脉数均为 7 条, 无零余子。泉淮 1513、泉淮 1547 和大铭薯的茎蔓棱翼圆形, 叶片中等、薄革质, 叶柄较短, 有较多椭圆形或长椭圆形的零余子。其中, 下涌薯中熟, 产量一般, 粗多糖等品质成分含量较高, 商品性差, 中感炭疽病; 泉淮红皮白肉中熟, 丰产稳产性好, 品质成分含量较高, 较抗炭疽病; 泉淮 1515 中熟, 丰产又稳产, 品质成分含量一般, 中感炭疽病; 泉淮 1517 中熟, 丰产性好但稳产性差, 品质成分含量一般, 商品性差, 中抗炭疽病; 大

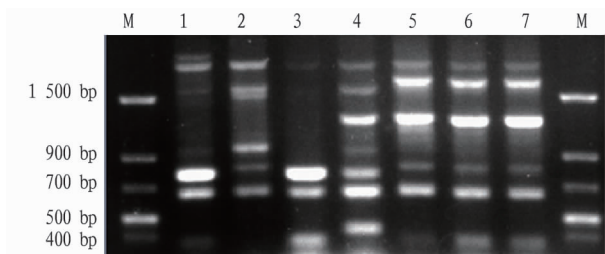
铭薯中晚熟, 产量较低, 品质成分含量较低, 抗炭疽病; 泉淮 1513 中晚熟, 产量低, 品质成分含量较低, 抗炭疽病; 泉淮 1547 中晚熟, 丰产稳产性较好, 品质成分含量较高, 商品率高, 抗炭疽病。

2.2 RAPD 标记的多态性 从 63 个 RAPD 引物中筛选出 31 个多态性较好的引物对 7 个淮山种质资源进行分析, 片段长度在 200~2 000 kb。一共得到 156 个多态性标记, 平均每个引物 5.03 个, 引物扩增出多态性位点最多达 10 个。表 1 为 31 个随机引物的引物编号及序列, 图 1 是 RAPD 引物 A-20 电泳结果。

表 1 随机引物编号与序列信息

Table 1 Random primer code and sequence information

序号 No.	引物编号 Primer code	引物序列 Primer sequence (5'—3')	序号 No.	引物编号 Primer code	引物序列 Primer sequence (5'—3')	序号 No.	引物编号 Primer code	引物序列 Primer sequence (5'—3')
1	A-20	GTTGCGATCC	12	OPA04	AATCGGGCTG	23	OPL12	GGGCGTACT
2	C-08	GTCCACACGG	13	OPA19	CAAACGTCCG	24	OPN14	TCGTGCGGGT
3	F-02	GAGGATCCCT	14	OPA20	GTTGCGATCC	25	OPN18	GGTGAGGACA
4	G-05	CTGAGACGGA	15	OPB01	GTTTCGCTCC	26	OPN20	GGTGCTCCGT
5	G-17	ACGACCGACA	16	OPB03	CATCCCCTG	27	OPO04	AAGTCCGCTC
6	OPF-13	GGCTGCAGAA	17	OPB13	TTCCCCGCT	28	OPO05	CCCAGTCACT
7	S112	AGCCGACAAG	18	OPC08	TGGACCGGTG	29	OPQ01	GGGACGATGG
8	S290	CAAACGTGGG	19	OPG05	CTGAGACGGA	30	OPQ12	AGTAGGGCAC
9	S372	TGGCCCTCAC	20	OPG08	TCACGTCCAC	31	OPR02	CACAGCTGCC
10	AD-01	CAAAGGGCGG	21	OPJ13	CCACACTACC			
11	OPH-12	ACGCGCATGT	22	OPK04	CCGCCCAAAC			



注: M 为 Trans DNA Marker1500; 1 为下涌薯; 2 为泉淮红皮白肉; 3 为泉淮 1515; 4 为泉淮 1517; 5 为大铭薯; 6 为泉淮 1513; 7 为泉淮 1547

Note: M is Trans DNA Marker1500; 1 is the Xiayongshu; 2 is Quanhui red skin and white meat; 3 is Quanhui 1515; 4 is Quanhui 1517; 5 is Damingshu; 6 is Quanhui 1513; 7 is Quanhui 1547

图 1 RAPD 引物 A-20 电泳结果

Fig.1 Electrophoretic result of RAPD primer A-20

2.3 遗传距离分析 RAPD 标记计算的各淮山种质资源之间的平均遗传距离为 0.37~0.49, 总平均遗传距离为 0.45(表 2)。依据遗传距离的大小, 分为 2 类, 组间的遗传距离为 0.32, 第一类群的平均遗传距离为 0.44, 较第二类群的平均遗传距离(0.21)远, 说明第一类群的淮山种质遗传多样性大; 其中, 泉淮红皮白肉的平均遗传距离 0.49 为最大, 泉淮 1547 的平均遗传距离最小, 仅为 0.37, 说明泉淮红皮白肉具

备较为丰富的遗传变异性。

表 2 淮山种质资源的遗传距离

Table 2 Genetic distance of *Dioscorea polystachya* germplasm resources

类群 Group	名称 Name	品种平均 遗传距离 Average genetic distance of varieties	组内平均 遗传距离 Average genetic distance within groups	组间平均 遗传距离 Average genetic distance between groups
一	下涌薯	0.47	0.44	0.32
	泉淮红皮白肉	0.49		
	泉淮 1515	0.45		
	泉淮 1517	0.48		
二	大铭薯	0.41	0.21	
	泉淮 1513	0.42		
	泉淮 1547	0.37		

2.4 聚类分析 应用 RAPD 分子标记对 7 份淮山种质资源进行聚类分析, 结果显示: 下涌薯、泉淮红皮白肉、泉淮 1515 和泉淮 1517 品种间具有较大的遗传相似性, 聚在了同一类; 大铭薯、泉淮 1513 和泉淮 1547 的遗传相似性接近, 单独成一类。聚类结果和遗传距离的结果相一致, 说明通过这两大类群间杂交选育可获得更高的遗传变异。

3 讨论与结论

3.1 讨论 作为研究作物种质资源亲缘关系的一项技术,

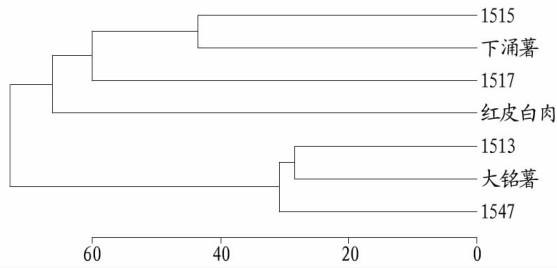


图2 淮山种质资源的聚类分析

Fig.2 Cluster analysis of *Dioscorea polystachya* germplasm resources

RAPD 标记具有检测容易、灵敏度高、引物无种属界限等特点,因此较其他鉴定技术如同工酶鉴定技术等更为有效。同时,与其他分子生物学检测技术一样,RAPD 标记容易受 PCR 反应体系中各组分浓度以及 PCR 仪器性能等因素的影响产生假带,稳定性也相对较差。因此,需要摸索其合适的反应条件,并对试验结果反复验证。

该研究通过 RAPD 方法测定了来源不同的 7 个淮山种质资源,得到的聚类结果与传统形态学分类结果有一定的一致性。聚类结果将 7 个淮山种质资源在平均遗传距离指数为 0.45 处分为 A 和 B 共 2 组,A 组中的泉淮红皮白肉和泉淮 1517 在产量上较下涌薯与泉淮 1515 高,与聚类分析中显示出的泉淮红皮白肉和泉淮 1517 遗传距离较远结果相一致;B 组中的大铭薯、泉淮 1513 和泉淮 1547 在叶形、茎蔓形态和产量等方面相接近,在传统形态学分类上可以分为同一类。可见,供试的 7 个淮山种质资源遗传亲缘关系与其产量存在一定相关性,详细情况可待进一步研讨。

3.2 结论 RAPD 分子标记在淮山的遗传多样性分析中具有较高的多态性,能够帮助研究者在基因组的 DNA 水平上

掌握其多样性,可尝试选择遗传距离较远的亲本进行配组杂交,获得遗传变异丰富的后代材料。该研究结果表明:泉淮红皮白肉与其他供试淮山种质资源存在大的遗传距离,具有较大的遗传变异,通过配组杂交,较容易获得综合性状好的后代材料;而大铭薯、泉淮 1513 和泉淮 1547 的遗传多样性较低,应该优先考虑与类群外的亲本材料配组杂交,才能进一步扩大其遗传多态性。

参考文献

- [1] 郑晗,龚千锋,张的凤.山药[J].食品与药品,2007,11(9):74-76.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(2010年版第一增补本)[S].北京:中国医药科技出版社,2010.
- [3] 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.
- [4] 李晶,秦天才.盾叶薯蓣居群亲缘关系的 RAPD 分析[J].湖北农业科学,2005(4):20-22.
- [5] 李明军,徐鑫,张晓丽,等.山药基因组 DNA 的提取和 RAPD 反应条件的优化[J].河南师范大学学报(自然科学版),2007,35(1):140-143.
- [6] 华树妹,涂前程,雷伏贵.福建山药种质资源遗传多样性的 RAPD 分析[J].植物遗传资源学报,2009,10(2):195-200.
- [7] 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.
- [8] MIGNOUNA H D, ASIEDU R A. genetic linkage map of Guinea yam (*Dioscorea rotundata* Poir.) based on isozyme, RAPD and AFLP markers[M]. San Diego, California; [s.n.], 1999.
- [9] SAGHAI-MAROOF M A, SOLIMAN K M, JORGENSEN R A, et al. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics[J]. Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America, 1984, 81(24): 8014-8018.
- [10] NEI M, LI W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases[J]. Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America, 1979, 76(10): 5269-5273.
- [11] R Development Core Team. The R project for statistical computing[Z]. 2015.
- [12] 邹阿玲,李胜利,张万金,等.应用 DHI 技术对奶牛生产性能的影响[J].中国奶牛,2012(24):40-43.
- [13] 王玲玲.DHI 在奶牛生产中的应用[J].现代畜牧兽医,2011(9):27-29.
- [14] 胡宁玺.DHI 技术在西门塔尔牛生产管理中的指导作用初探[J].中国奶牛,2014(22):61-63.
- [15] 石璞,许尚忠.奶牛 DHI 中的体细胞测定与牧场管理[J].中国奶牛,2007(6):22-24.
- [16] 何开兵,徐焯,田新玲.奶牛生产性能测定数据的分析与应用[J].中国奶牛,2018(6):54-57.
- [17] 李建斌,孙少华,田雨泽,等.应用 DHI 提供的体细胞数据控制奶牛乳房炎[J].当代畜牧,2004(2):17-19.
- [18] NORMAN H D, MILLER R H, WRIGHT J R, et al. Herd and state means for somatic cell count from dairy herd improvement[J]. Journal of dairy science, 2000, 83(12): 2782-2788.
- [19] 冯军科,赵德明.乳房炎疫苗对奶牛体细胞数及隐性乳房炎的影响研究[J].中国奶牛,2018(4):33-37.
- [20] 陈艳珍.影响牛乳成分含量变化的因素[J].乳业科学与技术,2005,27(4):186-188.
- [21] 邹思湘.动物生物化学[M].4版.北京:中国农业出版社,2005:150-151.
- [22] 吴心华,温万,脱征军,等.奶牛酮病的综合防控技术[J].中国乳业,2018(1):48-52.
- [23] 于江明,刘胜军.黑龙江某规模化奶牛场荷斯坦牛群主要 DHI 指标分析[J].畜牧与饲料科学,2014,35(10):4-6.
- [24] 王洪荣.反刍动物瘤胃酸中毒机制解析及其营养调控措施[J].动物营养学报,2014,26(10):3140-3148.
- [25] 王新燕,温万,脱征军,等.DHI 报告解读及应用[J].畜牧与饲料科学,2016,37(5):75-78.

(上接第 110 页)

量也高;高峰日一般出现在产后 40~60 d,每月测定 1 次,则高峰日应出现在第 2 个测定日,即高峰日应低于平均值(70 d),如果高峰日大于 70 d,应该检查产犊时奶牛的体况、干奶期日粮以及围产期日粮。该牛场高峰日均处于正常高峰日范围。

3.4 平均泌乳天数 由于奶牛常年发情、产犊的生理特点决定了奶牛牛群的平均泌乳天数应处于合理范围,来保证牛群有较好的繁殖性能。如果牛群全年均衡产犊,牛群平均泌乳天数应介于 150~170 d,该指标可以反映牛群的繁殖性能和产犊间隔。2017 年 10 月至 2018 年 9 月该牛场牛群的平均泌乳天数为 184 d,表明该牧场繁育工作有效,但仍需要关注平均泌乳天数异常的牛只。泌乳天数大于 400 d 的牛只每月有 100 只左右,应该检查这部分牛只的状况并核对最后一次产犊日期登记是否有误,应加强牛群的繁殖管理。

参考文献

- [1] 浣成,罗阳,何芳,等.湖南省奶牛生产性能测定(DHI)大数据信息管理平台建设初探[J].安徽农业科学,2018,46(23):192-196.
- [2] 邢涛,朱爱军,郁星星.上海地区荷斯坦牛 DHI 指标变化规律研究[J].中国奶牛,2018(1):53-56.