

## 一种基于基因组 RAPD 分析的紫山药品种分子鉴定方法

刘庞源, 何伟明, 宋曙辉, 赵泓, 王慧杰 (国家蔬菜工程技术研究中心, 北京 100097)

**摘要** [目的] 研究一种基于基因组 RAPD 分析的紫山药品种分子鉴定方法。[方法] 以来自中国不同地区的 8 个紫山药品种为材料, 对 RAPD 技术在鉴定紫山药品种中的科学性进行技术上的验证与分析。[结果] 不同引物的 RAPD-PCR 结果在 8 种紫山药中体现出谱带清晰度及数量方面的不同特点, 其中引物 S1255 的多态性较高且谱带清晰, 可以此为基础鉴定紫山药的不同品种。[结论] 理想的反应条件能保证 RAPD 技术具有很好的稳定性, 是适用于鉴定紫山药品种的简易与理想的 DNA 分子标记。

**关键词** 紫山药; RAPD; 品种鉴定

**中图分类号** S632.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)22-09190-03

## A Molecular Identification Method for Purple Yam Cultivar Based on RAPD Analysis of Genome

LIU Pang-yuan et al (National Engineering Research Center for Vegetables, Beijing 100097)

**Abstract** [Objective] The aim was to study a molecular identification method for purple yam cultivar based on RAPD analysis of genome. [Method] Using 8 varieties of purple yam from different regions of China as materials, the scientificity of identification of purple yam cultivar by RAPD was technically verified and analyzed. [Result] The results of RAPD-PCR by different primers in the 8 kinds of purple yam showed different characteristic in the definition and quantity of bands, in which primer S1255 had higher polymorphism and clear bands, and varieties of purple yam could be determined on the basis of that. [Conclusion] The ideal reaction conditions could guarantee the good stability of RAPD, and it was a simple and ideal DNA molecular marker for the identification of purple yam cultivar.

**Key words** Purple yam; RAPD; Identification of cultivar

紫山药 (*Dioscorea alata* L.), 又名大薯、参薯、脚板薯、紫蒟药、紫淮山, 原产于亚洲热带地区, 属薯蓣科薯蓣属参薯种的可食用草本蔓生性植物。世界上大薯的种植地主要在西非、东南亚等地, 是西非等国的主要粮菜兼用植物, 我国也是大薯原产地之一。大薯中有白肉和紫肉品种, 紫肉品种是近几年因花青素的功效为大家所熟知而逐渐增加。紫山药(紫肉大薯)作为一种新兴的蔬菜资源, 目前对其的研究还很有限。最早记载有薯蓣的我国最早的一部药物学著作《神农本草经》中将山药列为上品, 是一种可药食兼用的材料。至明朝李时珍的《本草纲目》中仍然未明确的将两种植物分开, 仍统称为山药。

前期进行的一些研究表明, 紫山药的营 养及药用价值除 具普通山药的优点外, 还富含花青素, 适于食用、药用和加工利用。近年来, 随着人们对身体健康和营养保健的关注, 对紫色作物有高度的青睐, 特别是对紫山药这种药食同源、极具营养价值的食品高度喜爱。这表明紫山药具有潜在的开发价值, 既可作为蔬菜食用, 又可像怀山药作为一种温和的药材。

紫山药是一种适宜在短日照生长环境下生长的喜温类植物, 因其肉质红中带紫而得名, 主要分布于我国南方沿海诸省的温暖地带, 如浙江、江西、广东、广西、福建、海南、江西、云南、湖南、台湾等地。紫山药品种大都是地方品种, 虽然南方部分地区少量种植, 但栽培历史悠久。种植地区大都为丘陵山坡地带, 种植土壤土层深厚, 质地疏松, 有机质含量高, 保水、保肥能力强, pH 值为 4.5~6.5, 呈微酸性。紫山药块茎肥大, 单个块茎重 500 g 左右, 最大达 2 500 多 g, 肉质柔

滑, 风味独特, 色泽亮丽鲜美, 营养丰富, 肉质、色泽、味道、黏度、气味、口感、营养成分等商品化指标在全国的山药中首屈一指。紫山药的药用价值很高, 据《本草纲目》记载, 经常食用紫山药, 可降血压、血糖、抗衰益寿、健脑补智、增强人体免疫力和改善性功能, 是益于脾、肺、肾功能的珍贵药食兼用资源。

随着人们对紫山药的日益关注, 同时也激起了农民对紫山药的种植热情, 南方种植的紫山药品种有多种, 均统称为紫山药, 从形态上很难准确鉴别, 因此快速准确地鉴别紫山药品种是目前急需解决的问题。研究表明紫山药品种间在分子水平上存在显著差异, 因此从 DNA 水平上直接检测其差异, 并用于无性系品种的鉴别最为可靠。所以, 对紫山药进行遗传分析具有重要意义。该研究建立了一种基于基因组 RAPD 分析的紫山药常规品种分子鉴定方法, 旨在为紫山药品种的鉴别提供技术支持。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 供试材料共 8 个, 分别引种于浙江、江西、福建、广东、云南、台湾等地, 是当地的主栽品种(表 1)。随机引物购自上海生工生物工程公司, 2 × Easy Taq PCR SuperMix 和 DNA 分子量标准 Trans5K DNA Marker 购自北京全式金生物技术有限公司。

表 1 紫山药品种及其来源

编号	所属种	品种	来源
1	薯蓣科薯蓣属 <i>Dioscorea alata</i> .	紫山药	江西万载
2	薯蓣科薯蓣属 <i>Dioscorea alata</i> .	紫山药	浙江温州
3	薯蓣科薯蓣属 <i>Dioscorea alata</i> .	紫山药	福建武夷山
4	薯蓣科薯蓣属 <i>Dioscorea alata</i> .	紫山药	广东惠州
5	薯蓣科薯蓣属 <i>Dioscorea alata</i> .	紫山药	广东广州
6	薯蓣科薯蓣属 <i>Dioscorea alata</i> .	紫山药	云南文山
7	薯蓣科薯蓣属 <i>Dioscorea alata</i> .	紫山药	云南红河
8	薯蓣科薯蓣属 <i>Dioscorea alata</i> .	紫山药	台湾

**基金项目** 北京市科委重点课题(D131100000413001)。

**作者简介** 刘庞源(1965-), 女, 北京人, 副研究员, 从事种质资源的开发与利用研究, E-mail: liupangyuan@nervc.org。

**收稿日期** 2013-05-08

**1.2 样品处理** 采用正常生长的紫山药品种,每个品种 10 株,每株取 10 片新鲜幼叶放入冰盒中,置于  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  超低温冰箱中储存 24 h 后冷冻干燥成粉末状(由 SCANVAC 公司生产的 CoolSafe™ -55 -4 真空冻干机冻干后,用手轻微揉碎),将其充分混匀。

**1.3 DNA 提取及其纯度和浓度监测** 取幼叶干粉 0.2 g,采用改良  $2\times\text{CTAB}$ (提取缓冲液)提取总 DNA,使用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 的纯度,并利用蛋白核酸定量测定仪检测 DNA 浓度。 $2\times\text{CTAB}$  的配制:Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0) 100 mmol/L, EDTA- $\text{Na}_2$  (EDTA 二钠, pH 8.0) 20 mmol/L, NaCl 1.4 mol/L, CTAB 2% (20 g/L), DNA 提取前加入  $\beta$ -巯基乙醇 2 ml/L (0.2%)。

DNA 的提取:①取 6 ml 预热至  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  的  $2\times\text{CTAB}$  溶液于装有 0.2 g 叶片粉末的离心管中,  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  水浴 30 min, 间或轻摇几次,使粉末和溶液混匀;②取出离心管,待冷却后加入 6 ml 氯仿-异戊醇(体积比 24:1),置于摇床上 30 min 充分混匀;③ 12 000 r/min 离心 10 min;④将上清液转入新的离心管中,加入 2 倍体积预冷( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ )无水乙醇,混匀,在  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中放置 30 min,使核酸沉淀成絮状;⑤室温下 12 000 r/min 离心 10 min;⑥弃上清, DNA 沉淀风干后,溶解于 800  $\mu\text{l}$  去离子水中,作为 PCR 模板 DNA,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。

**1.4 引物筛选和 RAPD 分析** 预试验中对紫山药 RAPD-PCR 体系进行优化, DNA 模板量分别为 5、10、20、40、60、80、100 ng, 最终选择 20 ng。然后,选取 8 个(表 1)在形态上差异较大的紫山药品种进行 RAPD 引物(表 2)筛选。从得到的 DNA 指纹图谱中,筛选出 1 个扩增带清晰、多态性明显、重复性好的引物 S1255(TQACGCACGG)进行 PCR 扩增。

采用 S1255 引物在 Gene Amp PCR System 9700 PCR 扩增仪上进行 DNA 扩增 8 个紫山药品种,反应体系总体积为 20  $\mu\text{l}$ , 含 10  $\mu\text{l}$   $2\times\text{EasyTag PCR SuperMix} (+\text{dye})$  (北京全式金生物技术有限公司), 2  $\mu\text{l}$  5 mmol/L 引物, 20 ng DNA。反应程序为:  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  预变性 5.5 min;  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  变性 90 s,  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  复性 1 min,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸 2 min, 40 个循环;  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  后延伸 10 min。扩增产物用 1.6% (含 1% Golden view) 的琼脂糖凝胶电泳分离 2 ~ 3 h, 电压为 6 V/cm; 在 UV 光下检测扩增结果并通过凝胶成像系统(Gel Doc XR<sup>+</sup>)拍照, 分别得到 8 种紫山药的随机扩增多态 DNA 标准图谱。

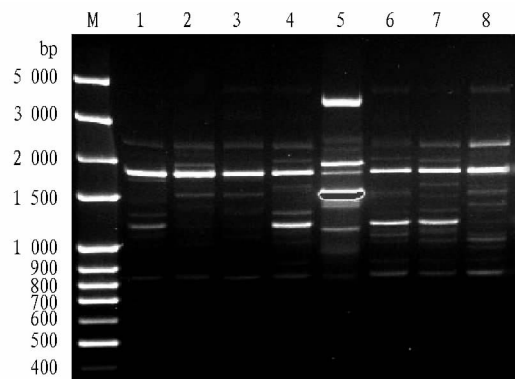
## 2 结果与分析

使用 Thermo 公司 NANODROP 2000 微量分光光度计直接测得 DNA 浓度,  $OD_{260}/OD_{280}$  值在 1.8 ~ 2.0 之间,  $OD_{260}/OD_{230}$  的比值在 2.0 ~ 2.5 之间, DNA 浓度大于 10 mg/ml, 可用于之后的 RAPD-PCR 反应。每个引物扩增产生一种特有 RAPD 指纹图谱, 如图 1 中利用 S1255 引物扩增的 RAPD 指纹图谱。对于每个供试紫山药品种的 5 个重复个体而言, 引物 S1255 分别扩增出了一致的 DNA 指纹图谱, 没有出现多态性, 从分子水平上说明, 无性繁殖不影响供试植株的遗传结构。由 8 种紫山药的随机扩增多态 DNA 标准图谱, 可看出 S1255 引物扩增出了特异 DNA 指纹, 8 种紫山药

品种扩增图谱相互之间有明显不同, 可同时区分出 8 种紫山药品种。

表 2 130 个随机引物编号及序列

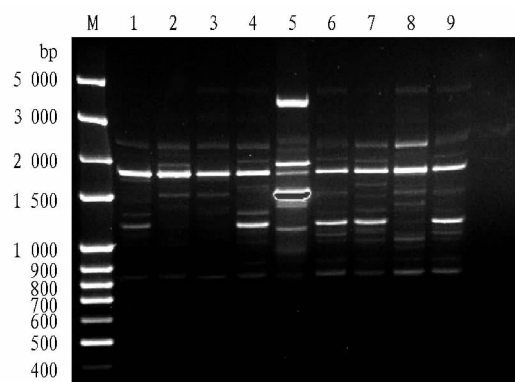
序号	引物 编号	系列(5'-3')	序号	引物 编号	系列(5'-3')
1	S1001	TCCGCAACCA	66	S1266	TCTCTAGGGG
2	S1002	CACCTCCGCT	67	S1267	AGACCCTTGG
3	S1003	GGTACTGCC	68	S1268	CACCGATCCA
4	S1004	CTCCCAGAC	69	S1269	ACGGCCAATC
5	S1005	TTGAGGCAG	70	S1270	GGCGTATGTT
6	S1006	GTAAGCCCTG	71	S1271	CTTCTCGGCT
7	S1007	CCCTACGGAG	72	S1272	CCACTCGTCT
8	S1008	TTCCGTGCC	73	S1273	CCAAGCACAC
9	S1009	AGAACCAGG	74	S1274	CACCTCGACC
10	S1010	GGGATGACCA	75	S1275	TGCTGACGAC
11	S1011	TCCGCTGAGA	76	S1276	TCTTAGGCGG
12	S1012	TCCAACGGCT	77	S1277	TTGGCATCCC
13	S1013	TGAGTCCGGA	78	S1278	CACCACTAGG
14	S1014	TGTGGCCGAA	79	S1279	AGCCTGGGGA
15	S1015	CTACAGCGAG	80	S1280	GTCGAAACCC
16	S1016	C AAGTGGGT	81	S1321	GTGTGCCGTT
17	S1017	CAGTGGGGAG	82	S1322	GGGAGGCCAAA
18	S1018	GGGCTAGTCA	83	S1323	CCAAGAGGCT
19	S1019	GGCAGTTCTC	84	S1324	TCCCAGGAG
20	S1020	GGAAGGTGAC	85	S1325	AGTGCACACC
21	S1021	GGCATCGGTC	86	S1326	AGGCATCGTG
22	S1022	AGCCGTTCCG	87	S1327	ACGGCACAGA
23	S1023	GGTCCAAAG	88	S1328	AGTATGGCGG
24	S1024	CTATCCTGCC	89	S1329	GGAAGTCTCT
25	S1025	GTCTAGCCGG	90	S1330	CCAGGCTGAC
26	S1026	TTCCGCACCT	91	S1331	TGATTCGGCG
27	S1027	ACGAGCATGG	92	S1332	GGTCGGGCTCA
28	S1028	AAGCCCCCA	93	S1333	GAGCACTGCT
29	S1029	TCGTGTGGTT	94	S1334	CACGGGCTTG
30	S1030	TCGGGGCATC	95	S1335	CAGCAATCCC
31	S1031	ACCGCGATGA	96	S1336	GTCTGTCCGG
32	S1032	GACCGGAACC	97	S1337	TGGGCTCTGG
33	S1033	ACGCTGCGAC	98	S1338	GTGTGCACTG
34	S1034	TGTTGCACTC	99	S1339	CCCTGTCCGA
35	S1035	GACACAGCCC	100	S1340	ACACTCGGCA
36	S1036	AAGGCAGGAG	101	S1341	GTCCACTCT
37	S1037	CCTCACGTCC	102	S1342	TGCGAAGGCT
38	S1038	TCGGGAACC	103	S1343	TTTCCGGGAG
39	S1039	GGCAAAGCTG	104	S1344	AAGGCTCGAC
40	S1040	CCTGTTCCCT	105	S1345	TCCGTGCGTT
41	S1241	CAGTGGTTCC	106	S1346	GGCTTCGCAA
42	S1242	CAGGTCTAGG	107	S1347	GACCGTCTGT
43	S1243	GACTGGGAGG	108	S1348	AGGCTTCGCT
44	S1244	TTGCCTCGCC	109	S1349	CCGATCCAAC
45	S1245	ACACTGCCCA	110	S1350	CAAGCCCTTC
46	S1246	CCGTCCCTGA	111	S1351	ACGGCGCTTC
47	S1247	ACTGCGACCA	112	S1352	CTGTGCGGCT
48	S1248	TCCTCGTGGG	113	S1353	CCGCTCGTAA
49	S1249	CCGTTAGCCT	114	S1354	GGTGGGTAGA
50	S1250	ACCTCCGGTC	115	S1355	CCAAGAGGCA
51	S1251	CCAGATCTCC	116	S1356	GGTGTGGTTC
52	S1252	CTGCCTAGCC	117	S1357	GGTGATTCCG
53	S1253	CTGTTGGAAG	118	S1358	ACCCCAACCA
54	S1254	GTGCCGCACT	119	S1359	AACTTGGCCC
55	S1255	TGACGCACGG	120	S1360	TCAATCGCCC
56	S1256	CTCTCCGTAG	121	S1361	TCGGATCCGT
57	S1257	AGCGACTGCT	122	S1362	CCTGAACGGA
58	S1258	CCAGCTGTGA	123	S1363	GGCTGTGTGG
59	S1259	ACCAAGGCAC	124	S1364	CCAGCCTCAG
60	S1260	ACATCAGCCC	125	S1365	TCCGCATACC
61	S1261	GGGATGGAAC	126	S1366	CCTTCGGAGG
62	S1262	CCAACCCGCA	127	S1367	CACGAGTCTC
63	S1263	ACGAAACGGG	128	S1368	TCGCTCGTAC
64	S1264	GGCTTCTGTC	129	S1369	CCTTGACCCC
65	S1265	GAGTACCCTG	130	S1370	ACTCTGGGGA



注:M:DNA 分子量标准,Trans5K DNA Marker Go149(北京全式金生物技术有限公司);1~8:紫山药品种编号,见表1。

图1 8个紫山药品种采用引物 S1255 扩增的 RAPD 标准图谱

实例:待鉴定紫山药为从云南省市区农贸市场购买紫山药,编号为9号,用 S1255 引物扩增的 RAPD 指纹图谱如图2所示,经 RAPD 指纹图谱鉴定比较,判断待鉴定紫山药(9号)



注:M:DNA 分子量标准,Trans5K DNA Marker Go149(北京全式金生物技术有限公司);1~8:紫山药品种编号,见表1;9:待鉴定紫山药。

图2 8个紫山药品种及待鉴定紫山药采用引物 S1255 扩增的 RAPD 图谱

与云南文山品种(6号)的 DNA 图谱一致,确定该待鉴定紫山药品种为云南文山品种。

### 3 结论

将待鉴定的紫山药品种按该研究方法进行分析,得到所需鉴定紫山药品种的随机扩增多态 DNA 图谱,将此随机扩增多态 DNA 图谱与标准图谱进行比较判定,可判断是否为某种紫山药品种,从而为紫山药生产提供了品种选择的准确性,确保了紫山药生产的利益。

### 参考文献

- [1] AN N, GUO H B, KEW D. Genetic Variation in Rhizome Lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn. ssp. *nucifera*) Germplasm from China Assessed by RAPD-Markers [J]. *Agricultural Sciences in China*, 2009, 8(1): 31-39.
- [2] YANG R W, ZHOU Y H, DING C B, et al. Biological Plantarum, Relationships among *Leymus* species assessed by RAPD markers [J]. *Biologia Plantarum*, 2008, 52(2): 237-241.
- [3] WANG Y J, LU J N. The research on RAPD genetic markers of grape seedlessness gene [J]. *Journal of Northwest A & F University Nat Sci Ed*, 1996, 5(24): 10-20.
- [4] WILLIAMS J G K, KUBELIK A R, LIVAK J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. *Nucl Acids Res*, 1990, 18: 6531-6535.
- [5] LIN K H, LAI Y C, LI H C. Genetic variation and its relationship to root weight in the sweet potato as revealed by RAPD analysis [J]. *Scientia Horticulturae*, 2009, 120(1): 2-7.
- [6] CAI Y L, CAO D W, ZHAO G F. Studies on genetic variation in cherry germplasm using RAPD analysis [J]. *Scientia Horticulturae*, 2007, 111(3): 248-254.
- [7] 马艳芝, 张玉星. 梨种质资源遗传多样性研究中的 RAPD 技术引物筛选 [J]. *中国农学通报*, 2009, 25(11): 30-33.
- [8] 高道侠, 文海涛, 林励, 等. 江西酸橙不同栽培变种 RAPD 分析 [J]. *安徽农业科学*, 2009, 37(8): 3457-3459.
- [9] 李莉, 彭建营, 白瑞霞. 中国枣属植物亲缘关系的 RAPD 分析 [J]. *园艺学报*, 2009, 36(4): 475-480.
- [10] 杨向晖, 李平, 刘成明, 等. 枇杷属植物及其近缘属植物亲缘关系的 RAPD 分析 [J]. *果树学报*, 2009, 26(1): 55-59.
- [11] 宋曙辉, 刘庞源, 赵霖, 等. 紫山药对生长中大鼠营养生理功能的影响 [J]. *安徽农业科学*, 2012, 40(23): 11624-11627.
- [12] 郭磊, 王晨, 曹雪, 等. 葡萄夏芽成花过程中相关基因的 cDNA - RAPD 分析 [J]. *华北农学报*, 2011(2): 43-48.
- [13]  $-ta$  的聚合及分子标记选择 [J]. *生物工程学报*, 2004, 20(5): 708-713.
- [14] 杨杰, 杨金欢, 王军, 等. 稻瘟病抗病基因 *Pita* 和 *Pib* 在中国水稻地方品种中的分布 [J]. *华北农学报*, 2011(3): 1-6.
- [15] 太一梅, 袁琼芬, 杨从党, 等. 水稻精确定量栽培技术对稻瘟病的控制作用 [J]. *西南农业学报*, 2012(1): 149-152.
- [16] 黄晓璇, 马泽松, 陈映发, 等. 30% 爱苗 EC 防治水稻稻瘟病田间药效研究 [J]. *园艺与种苗*, 2011(3): 69-70, 123.
- [17] 孙永军, 施保国. 淮南市“水稻三病”发生规律及综合防治措施 [J]. *内蒙古农业科技*, 2012(2): 80-81.
- [18] 邹美汝, 张政兵. 新化县稻瘟病的流行原因及防控对策 [J]. *湖南农业科学*, 2012(12): 29-30.
- [19] 李四军. 水稻稻瘟病的发生规律及综合防治 [J]. *农业灾害研究*, 2012, 2(6): 18-21.

(上接第 9189 页)

- [11] VISSCHER P M, HALEY C S, THOMPSON R. Marker assisted introgression in backcross breeding programs [J]. *Genetics*, 1996, 144: 1923-1932.
- [12] 周海鹏, 占小登, 柴荣耀, 等. 具抗稻瘟病基因 *Pi25* 杂交稻恢复系的分子标记辅助选育 [J]. *中国水稻科学*, 2008, 22(6): 590-596.
- [13] 王惠梅, 陈洁, 施勇峰, 等. 稻瘟病抗性基因 *Pi25* 特异性 CAPS 标记的开发与验证 [J]. *作物学报*, 2012, 38(11): 1960-1968.
- [14] HITTALMANNI S, PARCO A, MEW T W, et al. Fine mapping and DNA marker-assisted pyramiding of the three major genes for blast resistance in rice [J]. *Theor Appl Genet*, 2000, 100: 1121-1128.
- [15] 柳武革, 王丰, 金素娟, 等. 利用分子标记辅助选择聚合 *Pi-1* 和 *Pi-2* 基因改良两系不育系稻瘟病抗性 [J]. *作物学报*, 2008, 34(7): 1128-1136.
- [16] 陈学伟, 李仕贵, 马玉清, 等. 水稻抗稻瘟病基因 *Pi-d(t)*、*Pi-b*、*Pi*