

## 江西山药种质资源遗传多样性及其组培苗遗传稳定性的 RAPD 检测

尹明华, 徐志坚, 黄 玮, 何霖森, 刘根华, 洪森荣\*

上饶师范学院生命科学学院, 江西 上饶 334001

**摘要:** 目的 对来自江西的 11 份山药种质资源进行遗传多样性分析, 并对其组培苗的遗传稳定性进行检测。方法 采用 RAPD-PCR 技术。结果 试验筛选出 20 条引物, 共扩增出 238 个条带, 其中 234 个为多态性带, 平均每个引物扩增出多态性带 11.7 条, 多态性条带比率为 98.32%, 材料间遗传相似系数为 0.575 6~0.970 6, 平均相似系数为 0.723 1。根据 UPGMA 聚类分析结果, 可在 0.634 8 的遗传相似系数上, 将 11 份山药种质资源聚成 5 大类群 (类群 I~V)。其中第 I 类群只包含黄独; 第 II 类群只包含瑞昌山药; 第 III 类群包括南城淮山药 1、千金薯、信州山药、永丰淮山药和铁棍山药, 说明南城淮山药 1、千金薯、信州山药、永丰淮山药与来源于河南焦作市温县的铁棍山药亲缘关系较近; 第 IV 类包括南城山药、南城淮山药 2、广丰药薯; 第 V 类只包括泰和竹篙薯。这个结果表明江西山药种质资源遗传多样性还是比较丰富的。同时, 江西山药带芽茎段连续继代 6 次后的组培苗 (处理组) 及其微型块茎实生苗 (对照组) 的 RAPD 分析结果也表明, 11 份山药品种均扩出 126~179 条可辨别的条带, 每个品种的处理组和对照组均出现了 5~18 条变异条带数, 表明江西山药各个品种带芽茎段连续继代 6 次后的组培苗存在着一定的体细胞无性系变异, 但它们与微型块茎萌发实生苗的遗传相似系数还是比较高, 说明它们的遗传性状还是比较稳定的, 并未影响到其基因型。结论 本实验结果可为江西山药引种育种、资源改良、品种鉴定、种质保存及其种苗培育提供可靠依据。

**关键词:** 江西山药; 种质资源; 遗传多样性; 组培苗; 遗传稳定性; RAPD 检测

中图分类号: R282.21 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)19-3486-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.19.022

## RAPD analysis of genetic diversity of *Dioscorea opposita* germplasm resources from Jiangxi and genetic stability of their plantlets

YIN Ming-hua, XU Zhi-jian, HUANG Wei, HE Lin-sen, LIU Gen-hua, HONG Sen-rong

College of Life Sciences, Shangrao Normal University, Shangrao 334001, China

**Abstract: Objective** To analyze the genetic diversity of 11 varieties of *Dioscorea opposita* germplasm resources from Jiangxi, and detect the genetic stability of the tissue cultured plantlets. **Methods** RAPD-PCR was applied. **Results** Twenty primers were screened out, 238 bands were amplified, 234 of them were polymorphic bands, the average amplified polymorphic bands were 11.7, and the ratio of polymorphic bands was 98.32%. The genetic similarity coefficient was 0.575 6—0.970 6 and the average similarity coefficient was 0.723 1. According to the results of UPGMA clustering analysis, the 11 *D. opposita* germplasm resources from Jiangxi province were divided into five categories: The first class included *D. bulbifera*. The second class included *D. opposita*. The third class included *D. opposita* Nancheng 1, *D. opposita*, *D. opposita*, *D. opposita*, and *D. opposita*, which showed that *D. opposita* 1, *D. opposita*, *D. opposita* and *D. opposita* had closer relationship with *D. opposita* came from Wenxian County, Jiaozuo City, Henan province. The fourth class included *D. opposita*, *D. opposita* Nancheng 2 and *D. opposita*. The fifth class included *D. opposita*. The RAPD analysis results of plantlets subcultured for six times by *in vitro* rapid propagation method of stem segment with a bud of *D. opposita* L. germplasm resources from Jiangxi province (treatment group) and their seedlings germinated from microtuber (control group) also showed that 11 yam varieties were spread out 126—179 identifiable bands and each variety appeared 5—18 mutation bands, which indicated plantlets subcultured for six times by *in vitro* rapid propagation method of stem segment with a bud of *D. opposita* germplasm resources from Jiangxi province existed somaclonal variation, but their genetic similarity coefficient compared with their

收稿日期: 2016-03-06

基金项目: 2014 年国家级大学生创新创业训练计划项目 (201410416003)

作者简介: 尹明华 (1973—), 女, 江西永新人, 硕士, 副教授, 从事生物技术研究。

\*通信作者 洪森荣, 男, 硕士, 副教授, 从事植物生物技术研究。E-mail: hongsenrong@163.com

seedlings germinated from microtuber was still relatively high, illustrating that their genetic traits were still relatively stable and did not affect their genotype. **Conclusion** The experimental results can provide the reliable basis for introduction breeding, resource improvement, variety identification, germplasm conservation, and their plantlet culture of *D. opposita* germplasm resources from Jiangxi province.

**Key words:** *Dioscorea opposita* L. in Jiangxi province; germplasm resources; genetic diversity; plantlets; genetic stability; RAPD analysis

山药 *Dioscorea opposita* L. 又名薯蓣, 为一年生或多年生缠绕性草质藤本, 是中国传统的药食同源植物, 主要食用部位为地下部肥大的肉质块茎<sup>[1]</sup>, 其味甘, 性平, 归脾、肺、肾经, 具有补脾养胃、生津益肺、补肾涩精的功能, 主治脾虚泄泻、食少浮肿、肺虚咳喘、消渴、肾虚尿频、遗精、带下等症<sup>[2-3]</sup>。山药块茎主要含有皂苷、黏液质、胆碱、山药碱、淀粉、糖蛋白、自由氨基酸、维生素 C、碘质及各种氨基酸, 并有人体不可缺少的碘、钙、铁和磷等微量元素<sup>[4]</sup>。山药中最主要的活性物质为多糖 (包括黏液质及糖蛋白)、尿囊素、胆碱多酚氧化酶等多种活性成分<sup>[5]</sup>。其中山药多糖是目前公认的山药主要活性成分, 也是近年来山药研究的热点, 具有促进肠胃功能、保护肝脏、降血糖、抗衰老、抗氧化、抗突变、抗肿瘤及提高免疫力等生理活性<sup>[6]</sup>。随着人们生活水平的日益提高以及对食品营养、安全、保健意识的逐渐增强, 人们对山药产品的需求量越来越大, 对山药研究也受到重视。

江西是我国正品山药的地道和主要产区之一, 出产的山药品质优良, 在国内外享有盛誉。当前, 江西生产上推广应用的主要为地方品种, 但品种退化严重, 病虫害抗性降低, 江西山药产业发展遇到了前所未有的挑战<sup>[7]</sup>。江西种植的山药品种繁多, 但大多为江西传统名优地方品种, 如南城县的南城药薯和南城淮山药、瑞昌的瑞昌山药、永丰的永丰山药、广丰的千金薯、泰和的竹篙薯等。这些山药的品质较好, 口感纯正, 销售价格高, 种植效益较好, 有些已成为产区的地理标志和品牌性品种资源。但目前江西山药品种较多, 市场上存在同物异名和同名异物的混乱现象, 而且假冒山药的现象日益严重。

近二三十年来, 植物组培技术对于作物种质资源的收集、繁殖和保存起着重要的作用, 并且显示出其实用价值。但在植物组织培养过程中, 体细胞无性系变异普遍存在, 这些变异有的是不能遗传的变异即表观遗传变异, 但大多数是可遗传变异, 这样就有可能存在遗传完整性损失的危险<sup>[8]</sup>。因此, 研究江西山药资源的遗传多样性及其组培苗的遗传稳定性对山药的引种育种、资源改良、资源鉴定和

生产加工等具有重要意义。

DNA 分子标记能够揭示物种核苷酸序列水平的遗传变异差异, 具有可靠、精确、多态性高等诸多优势, 在植物的鉴别、监管、多样性分析等中成为当前主要技术手段<sup>[9]</sup>。RAPD 是在 1990 年由 Williams<sup>[10]</sup>和 Welsh<sup>[11]</sup>同时开发出来的一项遗传标记技术, 由于其具有易扩增、多态性高、操作简便、无种属限制等优点而被广泛应用于不同类型植物遗传多样性和遗传稳定性研究中<sup>[12]</sup>。

目前, 关于山药种质资源遗传多样性和遗传稳定性分子标记分析的研究少见报道, 在国内, 华树妹等<sup>[13]</sup>对 34 份福建山药种质资源的遗传多样性进行了 RAPD 分析, 周延清等<sup>[14]</sup>、黄玉仙等<sup>[15]</sup>和李齐向等<sup>[16]</sup>分别对 28 份山药种质资源、94 份山药种质资源以及 90 份山药种质资源的遗传多样性进行了 ISSR 和 SRAP 分析, 但关于江西山药种质资源的分子标记分析尚未见报道。本研究采用 RAPD 技术研究江西山药种质资源遗传多样性及其组培苗遗传稳定性, 旨在为江西山药引种育种、资源改良、品种鉴定、种质保存以及其种苗培育提供可靠依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

供试材料为上饶师范学院生命科学学院课题组提供的 11 份来自江西不同地区的山药资源均由上饶师范学院生命科学学院王艾平教授完成鉴定, 见表 1。江西山药各个品种微型块茎萌发的实生苗 (对照组) 及其带芽茎段连续继代 6 次后的组培苗 (处理组) 用于本实验的 RAPD 分析。

黄独微型块茎萌发的实生苗、黄独带芽茎段连续继代 6 次后的组培苗、瑞昌山药微型块茎萌发的实生苗、瑞昌山药带芽茎段连续继代 6 次后的组培苗、南城山药微型块茎萌发的实生苗、南城山药带芽茎段连续继代 6 次后的组培苗、南城淮山药 1 微型块茎萌发的实生苗、南城淮山药 1 带芽茎段连续继代 6 次后的组培苗、南城淮山药 2 微型块茎萌发的实生苗、南城淮山药 2 带芽茎段连续继代 6 次后的组培苗、广丰药薯微型块茎萌发的实生苗、广丰药薯带芽茎段连续继代 6 次后的组培苗、广丰千金

表 1 用于 RAPD 分析的江西山药种质资源

Table 1 *Dioscorea opposita* germplasm resources from Jiangxi province used for RAPD analysis

名称	来源
黄独 <i>Dioscorea bulbifera</i>	上饶三清山
瑞昌山药 <i>D. opposita</i>	瑞昌市南阳乡
南城山药 <i>D. opposita</i>	南城县天井源乡
南城淮山药 1 <i>D. opposita</i>	南城县株良镇
南城淮山药 2	南城县天井源乡
广丰药薯 <i>D. opposita</i>	广丰县五都镇
广丰千金薯 <i>D. opposita</i>	广丰县少阳乡
上饶信州山药 <i>D. opposita</i>	上饶信州区茅家岭乡
泰和竹篙薯 <i>D. opposita</i>	泰和县万合镇
永丰淮山药 <i>D. opposita</i>	永丰县佐龙乡
铁棍山药 <i>D. opposita</i>	河南省焦作温县

薯微型块茎萌发的实生苗、广丰千金薯带芽茎段连续继代 6 次后的组培苗、上饶信州山药微型块茎萌发的实生苗、上饶信州山药带芽茎段连续继代 6 次后的组培苗、泰和竹篙薯微型块茎萌发的实生苗、泰和竹篙薯带芽茎段连续继代 6 次后的组培苗、永丰淮山药微型块茎萌发的实生苗、永丰淮山药带芽茎段连续继代 6 次后的组培苗、铁棍山药微型块茎萌发的实生苗、铁棍山药带芽茎段连续继代 6 次后的组培苗分别编号，依次为 S1~S22。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 采用 CTAB 法提取样品 S1~S22 基因组 DNA。在 65 °C 水浴锅中预热 CTAB 提取液；在液氮中迅速研磨样品，将粉末状材料转入 2 mL 离心管中，加入预热的 CTAB 提取液（每克样品加入 3~5 mL 的提取液），65 °C 保温 30~60 min，每隔 10 min 轻轻颠倒混匀；11 000 r/min 条件下离心 5 min，取上清转入新离心管；加入等体积酚-氯仿（1:1），充分混匀，12 500 r/min 离心 10 min，取上清转入新离心管；加入等体积氯仿，充分混匀，11 000 r/min 离心 10 min，取上清转入新离心管；重复以上步骤（加入等体积酚-氯仿以及加入等体积氯仿）；加入 2/3 体积的异丙醇混匀，室温放置，沉淀 15 min；11 000 r/min 条件下离心 6 min，弃上清；将沉淀用 70% 的乙醇漂洗 1 次，室温条件下 11 000 r/min 离心 2 min，弃上清，重复洗一次；提取产物取 2~3 μL 用 2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测，

其余置于 -20 °C 保存备用。

1.2.2 RAPD 分析 PCR 扩增体系（20 μL）为 DNA 模板 2 μL，引物 1 μL，蓝色 Mix 10 μL，去离子水 7 μL。PCR 扩增程序为 94 °C 预变性 3 min，然后进行 40 个循环：94 °C 变性 30 s，36 °C 复性 50 s，72 °C 延伸 1.5 min；循环结束后 72 °C 延伸 10 min，4 °C 保存。

1.2.3 RAPD 扩增产物的检测 在华树妹等<sup>[13]</sup>的基础上，对 24 对引物进行筛选，并从中筛选出扩增条带清晰、多态性好的 20 对引物对 22 个江西山药样品进行 PCR 扩增，引物信息见表 2，将 PCR 产物在 2.0% 的琼脂糖凝胶电泳中检测。

表 2 RAPD 分析随机引物编号与序列

Table 2 Random primer numbers and sequences used for RAPD analysis

引物编号	引物序列 (3'-5')	引物编号	引物序列 (3'-5')
XZJ-1	GTTGCGATCC	XZJ-11	GAGCCCTCCA
XZJ-2	CAAAGGGCGG	XZJ-12	CTGAGACGGA
XZJ-3	GGCAGGCAAG	XZJ-13	AGGGCCGTCT
XZJ-4	AACGGGCGTC	XZJ-14	ACGACCGACA
XZJ-5	ACGAGAGGCA	XZJ-15	TGCGCCCTTC
XZJ-6	GGTGACGCAG	XZJ-16	AAAGCTGCGG
XZJ-7	GAACGGACTC	XZJ-17	ACGGATCCTG
XZJ-8	GTCCACACGG	XZJ-18	GGCTGCAGAA
XZJ-9	GAGGATCCCT	XZJ-19	ACGCGCATGT
XZJ-10	GGCACTGAGG	XZJ-20	ACCTCAGCTC

1.2.4 数据统计分析 PCR 扩增产物的电泳位置在凝胶的某个相同迁移率位置上有 DNA 条带记为 1，无 DNA 条带记为 0。每次试验重复 2 次，只有稳定、清晰的多态性 DNA 条带才能用于数据分析。统计分析江西山药各品种对照组和处理组的扩增条带，计算江西山药各品种处理组的变异率（变异率 = 变异条带数 / 总条带数）。利用 N TSY S2pc (Version 2.10e) 软件，计算材料间的遗传相似系数，对得到的遗传相似性矩阵进行非加权组法 (UPGMA) 聚类分析，建立江西山药种质资源的聚类分析树状图。

2 结果与分析

2.1 DNA 质量检测

采用超微量核酸蛋白检测仪在 260、280 nm 测定江西山药 DNA 各个样品吸光度，其比值 ( $A_{260nm}/A_{280nm}$ ) 介于 1.7~1.9，表明提取的 DNA 可用于后续的实验。

2.2 江西山药遗传多样性分析

2.2.1 RAPD 多态性分析 图 1 为引物 XZJ-5、XZJ-6、XZJ-7 和 XZJ-8 的 PCR 扩增产物检测结果。RAPD 标记遗传多样性参数见表 3。

从表 3 可知,用筛选出的 20 对随机引物(XZJ1~

XZJ20) 共扩增出 238 个条带, 其中 234 个为多态性带, 平均每个引物扩增出多态性带 11.7 条, 平均多态性条带比率 (PPB) 为 98.32%, 平均每个位点的有效等位基因数为 1.533 9, Nei 基因多样性指数平均为 0.319 2, 平均 Shannon 表型多样性指数为 0.485 2。

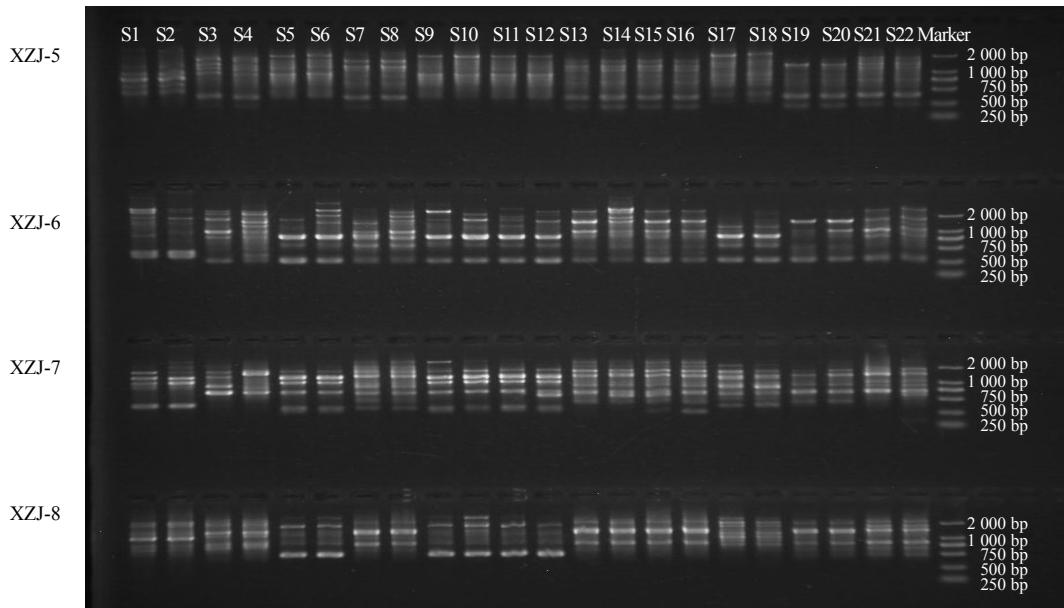


图 1 引物 XZJ-5、XZJ-6、XZJ-7 和 XZJ-8 的 PCR 扩增产物检测结果

Fig. 1 PCR amplification product detection results of primers XZJ-5, XZJ-6, XZJ-7, and XZJ-8

表 3 江西山药种质资源 RAPD 标记遗传多样性参数

Table 3 Genetic diversity parameters for RAPD marker in *D. opposite* germplasm resources from Jiangxi province

编号	样品	观测等位基因数	有效等位基因数	Nei 基因多样性指数	Shannon 表型多样性指数	多态位点	总位点	PPB/%
XZJ-1	22	2.000 0±0	1.415 3±0.272 0	0.272 1±0.125 1	0.433 9±0.152 1	10	10	100.00
XZJ-2	22	2.000 0±0	1.322 5±0.289 4	0.213 2±0.150 8	0.349 6±0.196 4	17	17	100.00
XZJ-3	22	1.923 1±0.277 4	1.253 2±0.255 9	0.175 9±0.142 1	0.296 3±0.198 6	12	13	92.31
XZJ-4	22	1.900 0±0.316 2	1.321 9±0.301 2	0.211 4±0.159 3	0.342 4±0.217 3	9	10	90.00
XZJ-5	22	2.000 0±0	1.347 1±0.224 8	0.239 1±0.122 5	0.389 9±0.163 0	13	13	100.00
XZJ-6	22	2.000 0±0	1.562 8±0.377 1	0.321 9±0.175 3	0.483 5±0.216 3	11	11	100.00
XZJ-7	22	2.000 0±0	1.481 7±0.350 7	0.288 4±0.169 9	0.443 0±0.214 6	13	13	100.00
XZJ-8	22	2.000 0±0	1.413 8±0.339 3	0.259 2±0.156 1	0.411 4±0.192 7	11	11	100.00
XZJ-9	22	2.000 0±0	1.478 4±0.316 1	0.293 6±0.154 8	0.452 6±0.196 8	13	13	100.00
XZJ-10	22	2.000 0±0	1.367 7±0.301 2	0.240 3±0.142 8	0.389 2±0.179 4	13	13	100.00
XZJ-11	22	2.000 0±0	1.608 9±0.298 9	0.358 2±0.129 0	0.535 5±0.152 4	7	7	100.00
XZJ-12	22	2.000 0±0	1.362 2±0.369 1	0.221 9±0.177 0	0.355 7±0.224 9	14	14	100.00
XZJ-13	22	2.000 0±0	1.483 0±0.374 0	0.285 0±0.177 5	0.437 9±0.221 7	12	12	100.00
XZJ-14	22	2.000 0±0	1.482 8±0.288 3	0.301 5±0.136 6	0.466 4±0.170 4	13	13	100.00
XZJ-15	22	1.875 0±0.353 6	1.293 6±0.256 4	0.201 6±0.147 7	0.330 7±0.209 7	7	8	87.50
XZJ-16	22	2.000 0±0	1.446 2±0.282 3	0.285 1±0.132 0	0.448 2±0.161 3	13	13	100.00
XZJ-17	22	2.000 0±0	1.429 5±0.309 5	0.269 5±0.157 2	0.421 6±0.203 3	13	13	100.00
XZJ-18	22	2.000 0±0	1.386 0±0.296 0	0.250 7±0.143 6	0.403 0±0.178 3	12	12	100.00
XZJ-19	22	2.000 0±0	1.477 4±0.351 9	0.285 5±0.175 5	0.437 9±0.224 2	11	11	100.00
XZJ-20	22	1.909 1±0.301 5	1.259 1±0.301 3	0.172 8±0.153 6	0.291 1±0.205 9	10	11	90.91
均值	22	1.983 2±0.128 8	1.533 9±0.313 6	0.319 2±0.143 7	0.485 2±0.177 9	11.7	11.9	98.32

RAPD 分子标记的分析结果表明,在物种水平上 11 个江西山药品种的遗传差异性较大。

**2.2.2 亲缘关系分析** 在 NTSYS 软件中计算样品间的遗传相似系数 ( $G_S$ ),得到供试材料遗传相似矩阵(表 4)。遗传相似系数越大,表明亲缘关系越近,遗传相似系数越小,表明亲缘关系越远。由表 4 可知 11 个山药品种的  $G_S$  值为 0.512 6~0.970 6,平均相似系数为 0.723 1。

从表 4 可知,在江西山药不同品种中,泰和竹篙薯(S17)和瑞昌山药(S3)的遗传相似系数最小,只有 0.512 6,这说明这两者的亲缘关系最远,南城淮山药 1(S8)和黄独(S1)的遗传相似系数也仅为 0.521 0,说明两者的亲缘关系也比较远。信州山药(S15)和千金薯(S13)的遗传相似系数最大,高达 0.928 6,说明这两者的亲缘关系最近,广丰药薯(S11)和南城山药(S6)的遗传相似系数也可达 0.873 9,说明这两者的亲缘关系也比较近。信州山药和千金薯以及广丰药薯和南城山药均有可能是相互引种及地方种叫法多样引起。

**2.2.3 聚类分析** 利用 NTSYS 软件对 22 份江西山药种质资源进行 UPGMA 聚类分析,结果如图 2 所示。在 0.717 3 的遗传相似系数上 22 份材料可以聚成 5 大类群,即类群 I~V。其中第 I 类群只包含 1 份材料,即黄独(S1 和 S2);第 II 类群也只包含 1 份材料,即瑞昌山药(S3 和 S4);第 III 类群共包含 5 份材料,分别是南城淮山药 1(S7 和 S8)、千金薯(S13 和 S14)、信州山药(S15 和 S16)、永丰淮山药(S19 和 S20)和铁棍山药(S21 和 S22);第 IV 类群包含 6 份材料,分别是南城山药(S5 和 S6)、南城淮山药 2(S9 和 S10)和广丰药薯(S11 和 S12);第 V 类群同样只包含 1 份材料,即泰和竹篙薯(S17 和 S18)。

**2.3 江西山药组培苗遗传稳定性分析**

用筛选出的 20 条 RAPD 引物对江西山药微型块茎萌发的实生苗(对照组)及其带芽茎段连续继代 6 次后的组培苗(处理组)基因组 DNA 样品进行扩增,结果见表 5。从表 5 中可知,11 份山药品种均扩出 126~179 条可辨认的条带,每个品种的处理组和对照组出现了 5~18 条变异条带数,这表明,

表 4 22 个江西山药样本的遗传相似系数矩阵

Table 4 Genetic similarity coefficient matrix of 22 samples of *D. opposita* from Jiangxi province

样本编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19	S20	S21	S22	
S1	1																						
S2	0.840	1																					
S3	0.613	0.597	1																				
S4	0.605	0.605	0.773	1																			
S5	0.676	0.651	0.643	0.634	1																		
S6	0.626	0.584	0.601	0.584	0.874	1																	
S7	0.559	0.534	0.66	0.626	0.630	0.613	1																
S8	0.521	0.529	0.639	0.613	0.609	0.584	0.903	1															
S9	0.605	0.58	0.605	0.613	0.836	0.777	0.634	0.639	1														
S10	0.576	0.542	0.592	0.592	0.824	0.832	0.672	0.685	0.853	1													
S11	0.592	0.584	0.618	0.618	0.874	0.874	0.655	0.626	0.861	0.891	1												
S12	0.647	0.622	0.630	0.588	0.853	0.794	0.643	0.630	0.849	0.819	0.853	1											
S13	0.571	0.571	0.639	0.580	0.592	0.559	0.828	0.824	0.647	0.634	0.618	0.630	1										
S14	0.559	0.542	0.651	0.618	0.605	0.605	0.798	0.786	0.651	0.655	0.655	0.643	0.870	1									
S15	0.584	0.584	0.634	0.576	0.605	0.580	0.798	0.794	0.626	0.622	0.622	0.634	0.929	0.882	1								
S16	0.550	0.559	0.601	0.567	0.588	0.571	0.807	0.803	0.634	0.639	0.63	0.626	0.920	0.891	0.924	1							
S17	0.546	0.529	0.513	0.496	0.634	0.626	0.592	0.580	0.622	0.626	0.643	0.655	0.580	0.584	0.584	0.576	1						
S18	0.567	0.559	0.559	0.550	0.681	0.655	0.622	0.601	0.651	0.647	0.689	0.702	0.609	0.605	0.613	0.605	0.836	1					
S19	0.630	0.613	0.664	0.622	0.668	0.626	0.752	0.723	0.639	0.66	0.634	0.664	0.790	0.794	0.794	0.777	0.588	0.643	1				
S20	0.613	0.580	0.664	0.597	0.643	0.601	0.777	0.756	0.639	0.643	0.618	0.672	0.840	0.811	0.836	0.794	0.605	0.651	0.933	1			
S21	0.597	0.546	0.647	0.580	0.609	0.592	0.744	0.731	0.622	0.626	0.618	0.622	0.756	0.744	0.744	0.744	0.655	0.643	0.714	0.748	1		
S22	0.592	0.534	0.643	0.567	0.597	0.580	0.731	0.718	0.618	0.613	0.613	0.626	0.761	0.739	0.748	0.748	0.651	0.647	0.702	0.752	0.971	1	

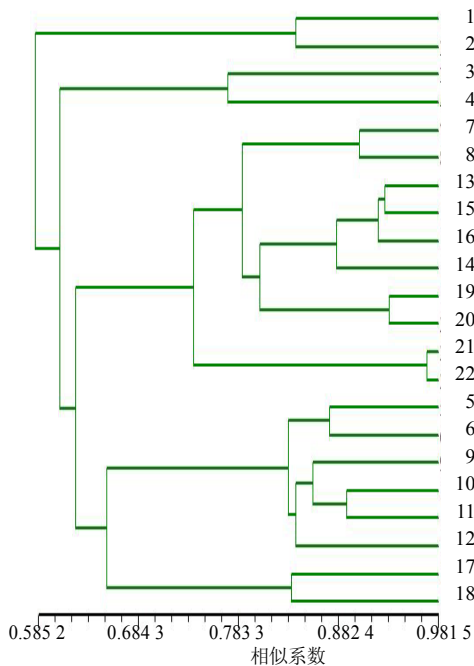


图2 基于 RAPD 标记的江西山药 22 个样本的 UPGMA 聚类分析

Fig. 2 UPGMA cluster analysis of 22 samples of *D. opposita* from Jiangxi province based on RAPD markers

江西山药各个品种带芽茎段连续继代 6 次后的组培苗与微型块茎萌发的实生苗之间有一定程度上的变异，可能是江西山药各个品种在组织培养过程中发生了一定的体细胞无性系变异。

从表 4 可知，在江西山药同一品种中，黄独对照组 (S1) 和处理组 (S2) 的  $G_S$  值为 0.840，瑞昌山药对照组 (S3) 和处理组 (S4) 的  $G_S$  值为 0.773，南城山药对照组 (S5) 和处理组 (S6) 的  $G_S$  值为 0.874，南城淮山药 1 对照组 (S7) 和处理组 (S8) 的  $G_S$  值为 0.903，南城淮山药 2 对照组 (S9) 和处理组 (S10) 的  $G_S$  值为 0.853，广丰药薯对照组 (S11) 和处理组 (S12) 的  $G_S$  值为 0.853，千金薯对照组 (S13) 和处理组 (S14) 的  $G_S$  值为 0.870，信州山药对照组 (S15) 和处理组 (S16) 的  $G_S$  值为 0.924，泰和竹篙薯对照组 (S17) 和处理组 (S18) 的  $G_S$  值为 0.836，永丰淮山药对照组 (S19) 和处理组 (S20) 的  $G_S$  值为 0.933 3，铁棍山药对照组 (S21) 和处理组 (S22) 的  $G_S$  值为 0.971。这表明江西山药各个品种带芽茎段连续继代 6 次后的组培苗在组织培养过程中虽然存在着一定的体细胞无性系变异，但它们与微型块茎萌发实生苗的  $G_S$  还是比较高，说明它们的遗传性状还是比较稳定的，并未影响到其基因型。

### 3 讨论

山药品种较多，市场上存在同物异名和同名异物的混乱现象。因此，研究山药遗传多样性对山药引种改良、品种鉴定和生产加工等均具有重要意义。周延清等<sup>[14]</sup>利用 ISSR 标记技术对河南温县农业科学研究所的 28 个山药品种进行了遗传多样性分析，将 28 个山药品种划分为 4 组，并将江西南城与铁棍山药归入第 4 组，结果表明，江西南城与铁棍山药在同一组，而实验结果也表明，南城淮山药 1、千金薯、信州山药、永丰淮山药与来源于河南焦作市温县的铁棍山药亲缘关系较近，这说明河南温县农业科学研究所保存的江西南城有可能为本实验中的南城淮山药 1。黄玉仙等<sup>[15]</sup>也对 94 份山药种质资源进行了 SRAP 标记分析，当遗传相似系数为 0.822 时，可将 94 份山药资源分为 5 类，而江西瑞昌山药也被归于第 I 类，即薯蕷类。1996 年，江西农业大学蔡余辉教授主持完成的国家自然科学基金课题“山药品种资源调查”也表明，在全国 80 多个山药品种中，江西瑞昌山药品质最优，其外观形色、口感风味、营养成分及保健效果都处于前列。本实验结果支持此观点，基于 RAPD 标记分析，第 II 类群只包含 1 份江西山药材料，即瑞昌山药，这个结果表明，江西瑞昌山药具有独特的品种特异性。在江西山药不同品种中，泰和竹篙薯和瑞昌山药的  $G_S$  最小，只有 0.512 6，这说明这两者的亲缘关系最远，南城淮山药 1 和黄独的遗传相似系数也仅为 0.521 0，说明这两者的亲缘关系也比较远。信州山药和千金薯的遗传相似系数最大，只有 0.928 6，说明这两者的亲缘关系最近，广丰药薯和南城山药的遗传相似系数也可达 0.873 9，说明这两者的亲缘关系也比较近。信州山药和千金薯以及广丰药薯和南城山药均有可能是相互引种及地方种叫法多样引起。根据 UPGMA 聚类分析结果，可在 0.717 3 的遗传相似系数上，将 11 份山药种质资源聚成 5 大类群，即类群 I~V。其中第 I 类群只包含黄独；第 II 类群只包含瑞昌山药；第 III 类群包括南城淮山药 1、千金薯、信州山药、永丰淮山药和铁棍山药，这说明南城淮山药 1、千金薯、信州山药、永丰淮山药与来源于河南焦作市温县的铁棍山药亲缘关系较近；第 IV 类包括南城山药、南城淮山药 2、广丰药薯；第 V 类只包括泰和竹篙薯。这个结果表明江西山药种质资源遗传多样性还是比较丰富的。

表 5 22 个江西山药样本基因组 DNA 样品的扩增条带

Table 5 Amplified bands of genomic DNA samples of 22 samples of *D. opposita* from Jiangxi province

引物编号	扩增条带数																					
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19	S20	S21	S22
XZJ-1	3	3	4	4	4	4	3	3	4	3	4	3	2	3	3	3	4	4	1	1	5	5
XZJ-2	5	5	3	5	4	6	3	4	5	4	4	4	4	4	5	5	5	4	2	3	4	4
XZJ-3	3	3	4	3	3	4	4	5	4	4	4	4	4	4	4	5	5	3	1	2	3	3
XZJ-4	3	2	4	2	3	3	4	5	3	4	2	3	4	4	4	4	4	3	3	4	4	4
XZJ-5	3	4	4	3	3	3	3	3	2	3	3	3	4	5	5	5	3	4	3	3	4	4
XZJ-6	4	3	5	6	4	7	5	7	4	5	6	5	5	7	6	4	4	4	4	5	5	5
XZJ-7	4	5	4	3	5	5	6	6	6	5	5	6	6	4	6	7	6	5	4	5	4	5
XZJ-8	3	2	3	3	4	4	3	3	3	4	4	4	3	3	3	3	5	4	3	3	5	6
XZJ-9	2	3	5	5	6	6	6	6	6	6	5	6	5	6	4	5	5	5	3	4	3	3
XZJ-10	3	5	7	7	4	5	4	5	5	5	5	5	3	3	3	3	4	4	3	3	4	4
XZJ-11	2	3	4	4	2	3	3	3	3	4	6	2	5	5	6	6	4	4	4	3	4	3
XZJ-12	3	3	5	7	4	4	5	5	5	5	4	4	4	3	4	5	5	5	1	2	2	2
XZJ-13	4	3	5	5	3	4	4	4	4	4	3	6	5	5	4	5	5	5	3	4	5	4
XZJ-14	6	4	5	4	4	5	4	5	5	5	5	3	6	6	5	5	7	5	3	4	6	6
XZJ-15	2	2	3	4	2	3	3	3	2	3	3	2	3	2	2	4	2	3	2	2	5	5
XZJ-16	6	5	4	3	4	5	2	2	6	5	5	4	5	4	6	4	5	5	4	4	4	4
XZJ-17	4	6	4	5	4	4	4	5	3	4	3	3	5	4	4	4	4	4	3	3	6	6
XZJ-18	4	4	3	4	4	4	6	6	4	4	4	4	5	4	5	5	7	6	4	4	6	5
XZJ-19	2	4	2	4	4	4	4	5	4	4	4	3	5	5	5	5	4	4	3	5	5	5
XZJ-20	4	5	4	3	2	2	3	3	2	2	2	2	3	4	3	4	6	4	4	4	4	4
总条带数	144	166	158	167	163	157	171	178	179	126	175											
变异条带数	18	18	12	9	11	17	13	12	13	12	5											
变异率/%	12.50	10.84	7.59	5.39	6.75	10.83	7.60	6.74	7.26	9.52	2.86											

在植物组织培养过程中，植物细胞生长是一个动态的过程，植株经过多次的转接继代后，会出现一些不正常的变异苗。试管苗的变异不是在某一代直接出现的，而是伴随着转接继代的次数增加，变异苗逐步增加<sup>[17]</sup>。18 棵刺槐组培苗经 RAPD 检测，结果表明，植株间的  $G_S$  为 0.86~0.96，存在着体细胞无性系变异<sup>[18]</sup>。二乔刺槐扦插苗与组培苗、四倍体刺槐扦插苗与组培苗的遗传距离分别为 0.18 和 0.17，二乔刺槐与四倍体刺槐两者的遗传距离为 0.25，可见，尽管组培苗与扦插苗有一定程度的变异，但并未影响到其基因型<sup>[19]</sup>。啤酒花茎尖分生组织培养获得的再生植株经 RAPD 检测也出现 1 株试管苗发生变异<sup>[20]</sup>。香蕉试管苗连续继代 10 次时，变异率高达 72%<sup>[21]</sup>。邱婧等<sup>[22]</sup>对不同继代次数（1~4 代）的霍山石斛试管苗进行分析，结果表明，以成熟种子和茎段为材料的继代培养，未探查变异，

具有较高的遗传稳定性。以愈伤组织为材料的继代培养，其试管苗后代从第 4 代开始，部分引物带型发生变化，但变化甚微，仅是带型强弱的改变。但本试验结果与其不一致。江西山药各个品种带芽茎段连续继代 6 次后的组培苗与微型块茎萌发的实生苗之间有一定程度上的变异，但它们的遗传相似系数还是比较高，说明它们的遗传性状还是比较稳定的。究其原因，可能是培养基中的植物生长调节剂的成分组成及浓度对体细胞无性繁殖产生了较大的影响。在江西山药各个品种组培苗带芽茎段离体快繁的过程中，经常会发现带芽茎段下部切口愈伤化并随后在愈伤处形成不定根的现象，而愈伤化恰恰容易引起植物体细胞无性系变异。因此，在江西山药各个品种的组培中，必须注意调整培养基中的细胞分裂素的量，尽量避免江西山药组培苗带芽茎段切口愈伤化的出现，以维持江西山药地方品种资源

的遗传稳定性。

总之, RAPD 技术是一种鉴定江西山药种质资源遗传多样性及其组培苗遗传稳定性的有效和实用的工具, 它能够检测到较高的多态性。用其所得到的多态条带有利于识别不同山药品种和同物异名、同名异物山药品种, 杜绝生产中假冒伪劣品种造成危害, 加强知识产权的保护, 对江西山药特色地方品种种质的开发利用以及优质种苗的工厂化培育均具有重要的指导意义。

#### 参考文献

- [1] 李丽红, 华树妹, 陈芝华, 等. 福建山药地方品种表型性状的遗传多样性研究 [J]. 云南农业大学学报: 自然科学版, 2016, 30(2): 257-262.
- [2] 尹明华, 王 丽, 徐玉琴, 等. 江西产山药微型块茎萌发苗耐盐性隶属函数及主成分分析 [J]. 中草药, 2016, 47(14): 2526-2533.
- [3] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [4] 高启禹, 赵英政. 山药多糖对昆明种小鼠生长性能及肠道菌群的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(20): 5685-5687.
- [5] 张亚锋, 舒蕊华, 王苑桃, 等. HPLC-MS/MS 法测定山药中尿囊素的量 [J]. 中草药, 2014, 45(24): 3627-3629.
- [6] 刘 璐, 乔 宇, 汪 兰, 等. 山药多糖的抗氧化作用研究 [J]. 食品科技, 2014, 39(12): 212-216.
- [7] 涂伟凤, 汤 洁, 涂玉琴, 等. 江西山药生产现状及发展优势 [J]. 江西农业学报, 2012, 24(11): 21-24.
- [8] 赵冬兰, 郑立涛, 唐 君, 等. 甘薯种质资源遗传稳定性及遗传多样性 SSR 分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2011, 12(3): 389-395.
- [9] 王洪振, 王 姝, 邝盼盼, 等. DNA 分子标记技术及其在植物育种中的应用 [J]. 吉林师范大学学报: 自然科学版, 2016, 37(1): 108-111.
- [10] Williams J G, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18(22): 6531-6535.
- [11] Welsh J, Mc C M. Finger printing genomes using PCR with arbitrary primers [J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18: 7213-7218.
- [12] 王剑锴, 李明杰, 王建明, 等. 金线莲 RAPD-SCAR 标记的开发和种质遗传多样性评价 [J]. 中草药, 2016, 47(1): 122-129.
- [13] 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.
- [14] 周延清, 景建洲, 李振勇, 等. 用 ISSR 标记技术分析山药品种遗传多样性 [J]. 实验生物学报, 2005, 38(4): 324-330.
- [15] 黄玉仙, 黄 姗, 梁康迳, 等. 基于 SRAP 标记的山药种质资源遗传多样性分析 [J]. 中国野生植物资源, 2011, 30(6): 48-54.
- [16] 李齐向, 华树妹, 雷伏贵, 等. ISSR 与 SRAP 在山药遗传多样性分析上的应用比较 [J]. 福建农业学报, 2013, 28(9): 876-883.
- [17] 王 炜, 杨随庄, 叶春雷, 等. 小麦体细胞无性系 HMW-GS 组成、蛋白质和赖氨酸含量及 SSR 位点变异分析 [J]. 麦类作物学报, 2016, 36(2): 157-164.
- [18] Kanwar K, Bindiya K. Random amplified polymorphic DNA (RAPDs) markers for genetic analysis in micropropagated plants of *Robinia pseudoacacia* L. [J]. *Euphytica*, 2003, 132(1): 41-47.
- [19] 黄茶英, 刘青林. 刺槐体细胞无性系变异的 RAPD 检测 [J]. 分子植物育种, 2006, 4(2): 251-254.
- [20] Patzak J. Assessment of somaclonal variability in hop (*Humulus lupulus* L.) *in vitro* meristem cultures and clones by molecular methods [J]. *Euphytica*, 2003, 131(3): 343-350.
- [21] Bairu M W, Fennell C W, Staden J V. The effect of plant growth regulators on somaclonal variation in Cavendish banana (*Musa* AAA cv. 'Zelig') [J]. *Sci Horticult*, 2006, 108(4): 347-351.
- [22] 邱 婧, 樊洪泓, 秦自清, 等. 利用分子标记检测霍山石斛不同继代次数试管苗的遗传稳定性 [J]. 分子植物育种, 2008, 6(3): 532-536.