

# 应用 SRAP 标记构建山药种质资源 DNA 指纹图谱

华树妹<sup>1</sup>, 贺佩珍<sup>1</sup>, 陈芝华<sup>1</sup>, 雷伏贵<sup>1</sup>, 曹奕鸯<sup>1</sup>, 黄玉仙<sup>2</sup>, 黄 珊<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>三明市农业科学研究院, 福建沙县 365051; <sup>2</sup>福建生物职业技术学院, 福州 350002; <sup>3</sup>三明市烟草公司沙县分公司, 沙县 365500)

**摘要:** 利用 30 对多态性良好的 SRAP 引物对 90 份山药种质资源进行 PCR 扩增, 构建扩增图谱, 共扩增到 722 个位点, 多态性位点 581 个, 多态性比例为 80.47%, 每对引物组合检测多态性位点 3~30 个, 每对引物能鉴别 6~51 份山药种质资源; 采用 DNA 数据分析软件对扩增出的多态性位点进行分析, 构建山药种质资源方框指纹图谱, 该图谱清晰地反映出每对引物能扩增的多态位点数、鉴别资源份数及资源具体编号, 资源在该引物组合下所能检测得到的多态位点数及所处的具体位置等信息; 从 10 对 SRAP 引物组合中挑选出的 21 个多态性位点, 根据谱带的有无转化成的 1/0 字符串编码, 形成山药种质资源 DNA 数字指纹图谱, 该图谱可鉴别区分 90 份山药种质资源中的 82 份资源。同时这些指纹图谱可为下一步的山药品种鉴定, 种质资源评价、利用, 分子标记辅助育种及品种权保护提供技术支撑。

**关键词:** 山药; 种质资源; SRAP; DNA 指纹图谱

## DNA Fingerprint of *Dioscorea polystachya* Turcz. Germplasm Resources Based on SRAP Marker

HUA Shu-mei<sup>1</sup>, HE Pei-zhen<sup>1</sup>, CHEN Zhi-hua<sup>1</sup>, LEI Fu-gui<sup>1</sup>, CAO Yi-yang<sup>1</sup>, HUANG Yu-xian<sup>2</sup>, HUANG Shan<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>Sanming Agricultural Science Institute, Shaxian Fujian 365051; <sup>2</sup>Fujian Institute of Biological Engineering Technology,

Fuzhou 350002; <sup>3</sup>Sanming Tobacco Companies Shaxian Branch, Shaxian 365500)

**Abstract:** 90 *Dioscorea polystachya* Turcz. germplasm resources were screened using 30 pairs of polymorphic SRAP primer combinations. The amplification plot contained 722 sites, including 581 polymorphic sites with a proportion of 80.47%. Every primer combination could detect 3 to 30 polymorphic sites and each primer pair could identify 6 to 51 resources. DNA data analysis software was adopted to analyze polymorphic sites and build box fingerprint of *Dioscorea polystachya* Turcz. germplasm. The box fingerprint could clearly reflect the relationship of primer pair, resources, and polymorphic sites. Then, DNA digital fingerprint of *Dioscorea polystachya* Turcz. germplasm resources was formed according to the 1/0 string encoding with the presence or absence of bands using 21 polymorphic sites from 10 pairs of SRAP primer combinations. The DNA digital fingerprint could identify 82 *Dioscorea polystachya* Turcz. germplasm resources from all the 90 materials. These fingerprints were useful for variety identification and protection, evaluation and utilization of germplasm resources, molecular marker-assisted breeding of *Dioscorea polystachya* Turcz. in the future.

**Key words:** *Dioscorea polystachya* Turcz.; germplasm resource; SRAP; DNA fingerprint

山药 (*Dioscorea polystachya* Turcz.) 又称淮山、淮山药, 一年生或多年生, 具双子叶植物特征特性的单子叶缠绕性藤本植物<sup>[1-3]</sup>。许多国家将山药列为药、食两用作物, 我国早就将山药和地黄、菊花、

地膝合称为“四大怀药”<sup>[4-6]</sup>, 美国、英国及日本也将山药列入药典, 许多国家将其列为生产燃料乙醇的重要候选植物<sup>[7]</sup>。自 2009 年国家财政部、农业部联合启动淮山药行业科研专项以来, 我国十

收稿日期: 2013-08-29 修回日期: 2013-10-12 网络出版日期: 2014-04-08

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20140408.0838.006.html>

**基金项目:** 福建省自然科学基金项目 (2012J01421); 国家级星火计划项目 (2011GA720020); 国家公益性行业 (农业) 科研专项 (200903022)

第一作者主要从事淮山药种质资源及遗传育种研究。E-mail: hsm20082006@126.com

贺佩珍为共同第一作者, 主要从事淮山药遗传育种研究及科研管理工作。E-mail: info@smnks.com.cn

分重视山药种质资源的收集、鉴定、评价及利用等研究<sup>[8]</sup>。近年来,随着生物技术的发展,已有许多分子标记被开发,并不断将该技术用于山药遗传多样性研究<sup>[9-10]</sup>、基因定位<sup>[11-12]</sup>、遗传连锁图谱和指纹图谱构建<sup>[13]</sup>。周生茂等<sup>[14]</sup>克隆到影响参薯块茎花青素形成的 ANS 基因;华树妹等<sup>[15]</sup>用 RAPD 标记对 34 份福建山药进行遗传多样性分析,并将 34 份福建山药资源分成 4 类:普通山药、参薯、扁山药及福建大薯。黄玉仙等<sup>[16]</sup>、黄姗<sup>[17]</sup>运用 SRAP 技术分析了山药种质资源遗传多样性,当遗传相似系数(GS)为 0.822 时,94 份资源可分为 5 类。侯进慧等<sup>[18]</sup>用核糖体对山药进行分类,结果表明:18S rDNA 序列的相似度较大,说明物种间差异较小,而叶绿体核糖体 16S rDNA 序列在分析物种演化关系方面有较高的分辨率。雷伏贵等<sup>[19]</sup>用 ISSR 标记分析了山药的遗传多样性,将 94 份山药材料分为 4 类群,即薯蓣群、褐苞薯蓣群、山薯群、参薯群。总体来说,山药种质资源 DNA 水平上的研究多为分析其遗传多样性,也有一些涉及到指纹图谱的绘制,但在山药种质资源 DNA 指纹图谱的系统构建仍显不足。本研究利用 SRAP 技术构建山药种质资源 DNA 指纹图谱,以期山药的种质资源鉴定及分子辅助育种提供重要的科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

**1.1.1 供试材料** 本试验所用的 90 份材料均来自三明市农业科学研究院山药种质资源圃,材料编号、来源地及类群见表 1,其中薯蓣(*D. opposita* Thunb)20 份、褐苞薯蓣(*D. persimilis* Prain & Burkill)42 份、参薯(*D. alata* L.)22 份、山薯(*D. fordii* Prain & Burkill)6 份。

**1.1.2 主要试剂** Taq DNA 聚合酶、10 × PCR Buffer、dNTPs、200 bp Marker 等 PCR 试剂均购自 TaKaRa 公司;SRAP 引物购于上海生工生物工程有限公司(表 2);其他化学药品均为国产分析纯。

### 1.2 方法

山药基因组 DNA 提取采用改良 CTAB 法<sup>[20]</sup>,SRAP 反应体系为:10 × PCR Buffer (Mg<sup>2+</sup> Plus) 2 μL,模板 DNA (20 ng/μL) 1 μL, Taq 酶 (5U/μL) 0.4 μL,自由组合的正反向引物各 1 μL, dNTP Mixture (各 200 μmol/L) 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 补足至 20 μL。反

应程序为:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 1 min, 35 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 5 个循环;94 °C 变性 1 min, 60 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环, 72 °C 充分延伸 5 min;4 °C 保存。

扩增产物经 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶 (30% 丙烯酰胺 8 mL、1 × TBE 32 mL、10% 过硫酸铵 260 μL、TEMED 26 μL) 于 DYCZ-28D 型电泳仪上电泳检测,350 V 电压电泳 2 h。取出凝胶于固定液中 (冰醋酸 500 μL、10% 乙醇 100 mL) 固定 5 ~ 10 min;于硝酸银溶液 (20% 硝酸银 1 mL、固定液 100 mL) 中染色 6 ~ 8 min;于显影液 (甲醛 500 μL、3% NaOH 100 mL) 显色,直到出现清晰的 DNA 条带;拍照、统计。

### 1.3 数据统计

进行 3 次重复,在同一位点有清晰谱带的记为 1,缺失的记为 0,组成 1/0 矩阵,采用 PopGene32、DPS 及 DNA 指纹数据软件进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 SRAP 扩增图谱

从正反引物随机组合中筛选得到 30 对多态性比率达 60% 以上的引物组合,对 90 份山药材料进行 PCR 扩增,共扩增得到 722 个位点,多态性位点 581 个,多态性比例为 80.47%,体现出丰富的遗传多样性。每对引物组合检测的位点为 5 ~ 37 个,多态性位点为 3 ~ 30 个,每对引物的多态性比率为 60.0% ~ 92.3%,每对引物可鉴别出 6 ~ 51 份资源 (表 3),部分扩增图谱见图 1。

每对引物组合对山药种质资源都有鉴别能力,但鉴别能力差异较大,M9E8 只能鉴别出 6 份资源,而 M6E8 能鉴别出 51 份山药资源。在引物组合 M11E13 (图 1) 所能鉴别的 31 份资源中,薯蓣类群 5 份,褐色苞薯蓣类群 7 份,参薯类群 17 份,山薯类群 2 份,其中对参薯群鉴别能力最强,鉴别率达 77.27%。

### 2.2 方框指纹图谱的构建

将各引物组合扩增位点谱带构建的 1/0 矩阵数据导入 DNA 指纹图谱分析软件<sup>[21]</sup>进行统计分析,筛选出唯一的特征值,每个特征值所对应的材料即为该对引物组合所能扩增出具特异谱带的资源。依次对 SRAP 引物组合 1/0 矩阵数据进行运算,直到所有材料鉴别完毕为止,从而构建出 90 份山药种质资源的 DNA 指纹图谱 (图 2)。

表 1 90 份山药材料的编号及来源地

Table 1 Codes and origins of 90 yam materials

| 编号<br>Code | 来源地<br>Origin | 类群<br>Group                          | 编号<br>Code | 来源地<br>Origin | 类群<br>Group                          |
|------------|---------------|--------------------------------------|------------|---------------|--------------------------------------|
| 1          | 福建将乐 I        | <i>D. opposita</i> Thunb             | 46         | 福建建阳 V        | <i>D. alata</i> L.                   |
| 2          | 福建将乐 II       | <i>D. persimilis</i> Prain & Burkill | 47         | 福建安溪 II       | <i>D. alata</i> L.                   |
| 3          | 福建清流 I        | <i>D. persimilis</i> Prain & Burkill | 48         | 浙江温州 III      | <i>D. alata</i> L.                   |
| 4          | 福建永安 I        | <i>D. persimilis</i> Prain & Burkill | 49         | 福建清流 III      | <i>D. alata</i> L.                   |
| 5          | 福建建阳 I        | <i>D. persimilis</i> Prain & Burkill | 50         | 福建永春 I        | <i>D. alata</i> L.                   |
| 6          | 福建建阳 II       | <i>D. persimilis</i> Prain & Burkill | 51         | 广东广州 I        | <i>D. alata</i> L.                   |
| 7          | 福建建阳 III      | <i>D. persimilis</i> Prain & Burkill | 52         | 福建福安 I        | <i>D. alata</i> L.                   |
| 8          | 福建建阳 IV       | <i>D. persimilis</i> Prain & Burkill | 53         | 福建将乐 III      | <i>D. alata</i> L.                   |
| 9          | 福建连城 I        | <i>D. persimilis</i> Prain & Burkill | 54         | 福建德化 IV       | <i>D. alata</i> L.                   |
| 10         | 福建安溪 I        | <i>D. persimilis</i> Prain & Burkill | 55         | 福建将乐 IV       | <i>D. alata</i> L.                   |
| 11         | 陕西谷城 I        | <i>D. opposita</i> Thunb             | 56         | 福建云霄 I        | <i>D. alata</i> L.                   |
| 12         | 广西合浦 I        | <i>D. fordii</i> Prain &Burkill      | 57         | 福建云霄 II       | <i>D. alata</i> L.                   |
| 13         | 福建德化 I        | <i>D. persimilis</i> Prain & Burkill | 58         | 福建云霄 III      | <i>D. alata</i> L.                   |
| 14         | 福建德化 II       | <i>D. alata</i> L.                   | 59         | 福建漳州 I        | <i>D. alata</i> L.                   |
| 15         | 江西瑞昌 I        | <i>D. opposita</i> Thunb             | 60         | 福建漳州 II       | <i>D. alata</i> L.                   |
| 16         | 福建德化 III      | <i>D. persimilis</i> Prain & Burkill | 61         | 福建上杭 I        | <i>D. alata</i> L.                   |
| 17         | 福建清流 II       | <i>D. persimilis</i> Prain & Burkill | 62         | 福建德化 V        | <i>D. alata</i> L.                   |
| 18         | 福建明溪 I        | <i>D. persimilis</i> Prain & Burkill | 63         | 福建永安 III      | <i>D. alata</i> L.                   |
| 19         | 福建明溪 II       | <i>D. persimilis</i> Prain & Burkill | 64         | 福建政和 I        | <i>D. opposita</i> Thunb             |
| 20         | 福建宁化 I        | <i>D. persimilis</i> Prain & Burkill | 65         | 福建建瓯 I        | <i>D. opposita</i> Thunb             |
| 21         | 福建宁化 II       | <i>D. persimilis</i> Prain & Burkill | 66         | 福建建阳 VI       | <i>D. persimilis</i> Prain & Burkill |
| 22         | 福建建宁 I        | <i>D. persimilis</i> Prain & Burkill | 67         | 福建政和 II       | <i>D. persimilis</i> Prain & Burkill |
| 23         | 福建宁化 III      | <i>D. alata</i> L.                   | 68         | 海南五指山 I       | <i>D. persimilis</i> Prain & Burkill |
| 24         | 福建宁化 IV       | <i>D. persimilis</i> Prain & Burkill | 69         | 福建邵武 I        | <i>D. persimilis</i> Prain & Burkill |
| 25         | 福建宁化 V        | <i>D. opposita</i> Thunb             | 70         | 福建顺昌 I        | <i>D. persimilis</i> Prain & Burkill |
| 26         | 福建宁化 VI       | <i>D. persimilis</i> Prain & Burkill | 71         | 福建永安 IV       | <i>D. opposita</i> Thunb             |
| 27         | 福建安远 I        | <i>D. persimilis</i> Prain & Burkill | 72         | 福建将乐 V        | <i>D. fordii</i> Prain &Burkill      |
| 28         | 福建建宁 II       | <i>D. persimilis</i> Prain & Burkill | 73         | 福建泰宁 IV       | <i>D. persimilis</i> Prain & Burkill |
| 29         | 福建宁化 VII      | <i>D. persimilis</i> Prain & Burkill | 74         | 福建建瓯 II       | <i>D. persimilis</i> Prain & Burkill |
| 30         | 福建宁化 VIII     | <i>D. persimilis</i> Prain & Burkill | 75         | 福建永安 V        | <i>D. fordii</i> Prain &Burkill      |
| 31         | 福建泰宁 I        | <i>D. alata</i> L.                   | 76         | 江西上饶 I        | <i>D. opposita</i> Thunb             |
| 32         | 福建泰宁 II       | <i>D. persimilis</i> Prain & Burkill | 77         | 福建永安 VI       | <i>D. persimilis</i> Prain & Burkill |
| 33         | 河南焦作 I        | <i>D. opposita</i> Thunb             | 78         | 福建清流 IV       | <i>D. persimilis</i> Prain & Burkill |
| 34         | 山西太古 I        | <i>D. opposita</i> Thunb             | 79         | 福建大田 I        | <i>D. persimilis</i> Prain & Burkill |
| 35         | 浙江温州 I        | <i>D. persimilis</i> Prain & Burkill | 80         | 福建沙县 I        | <i>D. persimilis</i> Prain & Burkill |
| 36         | 浙江温州 II       | <i>D. opposita</i> Thunb             | 81         | 福建明溪 III      | <i>D. persimilis</i> Prain & Burkill |
| 37         | 山西平遥 I        | <i>D. opposita</i> Thunb             | 82         | 福建沙县 II       | <i>D. persimilis</i> Prain & Burkill |
| 38         | 河北保定 I        | <i>D. opposita</i> Thunb             | 83         | 福建长汀 I        | <i>D. persimilis</i> Prain & Burkill |
| 39         | 广东高州 I        | <i>D. fordii</i> Prain &Burkill      | 84         | 福建长汀 II       | <i>D. persimilis</i> Prain & Burkill |
| 40         | 山东郯城 I        | <i>D. opposita</i> Thunb             | 85         | 福建长汀 III      | <i>D. opposita</i> Thunb             |
| 41         | 安徽亳州 I        | <i>D. opposita</i> Thunb             | 86         | 福建漳平 I        | <i>D. persimilis</i> Prain & Burkill |
| 42         | 山东兖州 I        | <i>D. opposita</i> Thunb             | 87         | 福建漳平 II       | <i>D. opposita</i> Thunb             |
| 43         | 福建永安 II       | <i>D. fordii</i> Prain &Burkill      | 88         | 福建将乐 VI       | <i>D. persimilis</i> Prain & Burkill |
| 44         | 福建南平 I        | <i>D. fordii</i> Prain &Burkill      | 89         | 福建建宁 III      | <i>D. opposita</i> Thunb             |
| 45         | 福建泰宁 III      | <i>D. alata</i> L.                   | 90         | 辽宁海城 I        | <i>D. opposita</i> Thunb             |

I :某来源地的第 1 份资源; II :某来源地的第 2 份资源; III :某来源地的第 3 份资源; IV :某来源地的第 4 份资源; V :某来源地的第 5 份资源; VI :某来源地的第 6 份资源; VII :某来源地的第 7 份资源; VIII :某来源地的第 8 份资源

I :The first resource from somewhere, II :The second resource from somewhere, III :The third resource from somewhere, IV :The fourth resource from somewhere, V :The fifth resource from somewhere, VI :The sixth resource from somewhere, VII :The seventh resource from somewhere, VIII :The eighth resource from somewhere

表 2 SRAP 引物名称及其序列

Table 2 Names and sequences of SRAP primer

| 名称   | 正向引物序列                  | 名称   | 反向引物序列                  |
|------|-------------------------|------|-------------------------|
| Name | Forward primer sequence | Name | Reverse primer sequence |
| Me6  | TGAGTCCAAACCGGACT       | Em6  | GACTGCGTACGAATTCTG      |
| Me8  | TGA GTCCAAACCGGACA      | Em8  | GACTGCGTACGAATTCTC      |
| Me9  | TGAGTCCAAACCGGAAA       | Em9  | GACTGCGTACGAATTCTA      |
| Me10 | TGAGTCCAAACCGGAGG       | Em10 | GACTGCGTACGAATTCTA      |
| Me11 | TGAGTCCAAACCGGAAG       | Em11 | GACTGCGTACGAATTCAT      |
| Me12 | TGAGTCCAAACCGGAAC       | Em12 | GACTGCGTACGAATTCCA      |
| Me13 | TGAGTCCAAACCGGAGA       | Em13 | GACTGCGTACGAATTCAC      |

表 3 SRAP 扩增图谱对山药资源的鉴别能力

Table 3 Identification ability of *Dioscorea polystachya* Turcz. resources by SRAP amplification

| 引物<br>编号 | 扩增位点数<br>Amplified<br>Primer code<br>site number | 多态性位点数<br>Polymorphic<br>site number | 多态性比率<br>(%)<br>Polymorphic<br>site percent | 鉴定资源数<br>Identified<br>resource<br>number | 引物<br>编号 | 扩增位点数<br>Amplified<br>Primer code<br>site number | 多态性位点数<br>Polymorphic<br>site number | 多态性比率<br>(%)<br>Polymorphic<br>site percent | 鉴定资源数<br>Identified<br>resource<br>number |
|----------|--------------------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------------|-------------------------------------------|----------|--------------------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------------|-------------------------------------------|
| M6E6     | 27                                               | 22                                   | 81.5                                        | 40                                        | M10E12   | 28                                               | 25                                   | 89.3                                        | 34                                        |
| M6E8     | 26                                               | 24                                   | 92.3                                        | 51                                        | M10E13   | 37                                               | 30                                   | 81.1                                        | 19                                        |
| M6E9     | 17                                               | 13                                   | 76.5                                        | 25                                        | M11E6    | 20                                               | 15                                   | 75.0                                        | 12                                        |
| M6E10    | 15                                               | 13                                   | 86.7                                        | 19                                        | M11E8    | 19                                               | 14                                   | 73.7                                        | 13                                        |
| M8E6     | 23                                               | 15                                   | 65.2                                        | 28                                        | M11E10   | 35                                               | 29                                   | 82.9                                        | 24                                        |
| M8E8     | 16                                               | 12                                   | 75.0                                        | 15                                        | M11E11   | 32                                               | 26                                   | 81.3                                        | 32                                        |
| M8E9     | 17                                               | 13                                   | 76.5                                        | 9                                         | M11E12   | 26                                               | 23                                   | 88.5                                        | 33                                        |
| M8E10    | 20                                               | 17                                   | 85.0                                        | 10                                        | M11E13   | 29                                               | 26                                   | 89.7                                        | 31                                        |
| M9E6     | 16                                               | 12                                   | 75.0                                        | 12                                        | M12E6    | 5                                                | 3                                    | 60.0                                        | 12                                        |
| M9E8     | 9                                                | 7                                    | 77.8                                        | 6                                         | M12E10   | 30                                               | 25                                   | 83.3                                        | 40                                        |
| M9E9     | 18                                               | 14                                   | 77.8                                        | 12                                        | M12E11   | 29                                               | 24                                   | 82.8                                        | 38                                        |
| M9E11    | 28                                               | 20                                   | 71.4                                        | 31                                        | M12E12   | 35                                               | 30                                   | 85.7                                        | 32                                        |
| M10E6    | 26                                               | 20                                   | 76.9                                        | 27                                        | M12E13   | 26                                               | 23                                   | 88.5                                        | 37                                        |
| M10E10   | 25                                               | 20                                   | 80.0                                        | 26                                        | M13E12   | 26                                               | 19                                   | 73.1                                        | 10                                        |
| M10E11   | 33                                               | 25                                   | 75.8                                        | 22                                        | M13E13   | 29                                               | 22                                   | 75.9                                        | 29                                        |

的最佳效果。经过反复验证,以最少多态性谱带能够鉴别出最多资源为原则,最后挑选出来源于 10 对引物的 21 条多态性谱带,把 82 份山药资源区分开,剩下的 8 份资源即使使用 30 对引物组合扩增得到的 581 条多态性谱带也无法鉴别开,无法鉴别的 8 份资源编号为 6(福建建阳 II)、20(福建宁化 I)、26(福建宁化 VI)、71(福建永安 IV)、73(福建泰宁 IV)、82(福建沙县 II)、83(福建长汀 I)、86(福建漳平 I)。这 21 条谱带由 M6E6、M6E8、M6E9、M8E8、M9E6、M9E11、M10E11、M11E13、M12E11 和 M12E12 共计 10 对引物扩增得到。每份资源在挑选出的 21 个相应位点有扩增谱带记为 1,无则记为 0,结果由 1 和 0 排列形成

图 2 中每列都代表 1 份资源在该引物组合下所能扩增出的特异带谱,M11E10 可扩增出 29 个多态性位点,对应图 2 中每列 29 个方框,其中黑色框表示某一资源在该位置有扩增位点,白色框表示某一资源在该位置无扩增位点。M11E10 共扩增出 35 个位点,其中多态性位点 29 个,多态性比率为 82.86%,能从 90 份资源中鉴别出 24 份资源。

### 2.3 数字指纹图谱的构建

利用尽量少的引物扩增到足够多的理想谱带,将尽量多的品种资源分开,这是分子鉴定种质资源

字符串,构成一份资源的数字指纹图谱(表 4)。每份资源都有唯一的指纹(身份编码),根据数字指纹图谱可较容易地鉴别出 82 份山药种质资源。

## 3 讨论

DNA 指纹图谱多数是基于特异引物微卫星标记 SSR 来构建的,如马铃薯<sup>[21]</sup>、棉花<sup>[22]</sup>、甘蓝<sup>[23]</sup>等,主要因为与非特异引物相比,特异引物具特异性的扩增产物、重现性强、多态性高等特点。山药的分子标记研究起步较晚,目前还未开发出适用于山药构建 DNA 指纹图谱的微卫星标记,谷凤平等<sup>[24]</sup>、雷天刚等<sup>[25]</sup>研究表明非特异引物可用于构建 DNA 指纹图谱。林戎斌等<sup>[26]</sup>的研究结果表明,相对于 RAPD

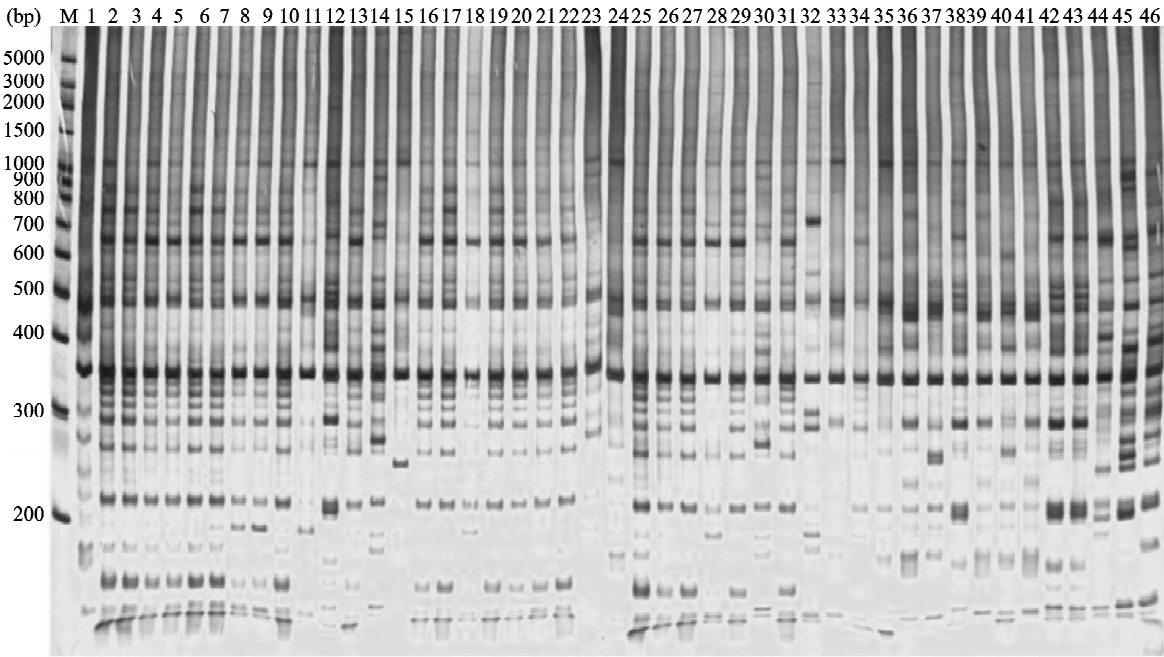
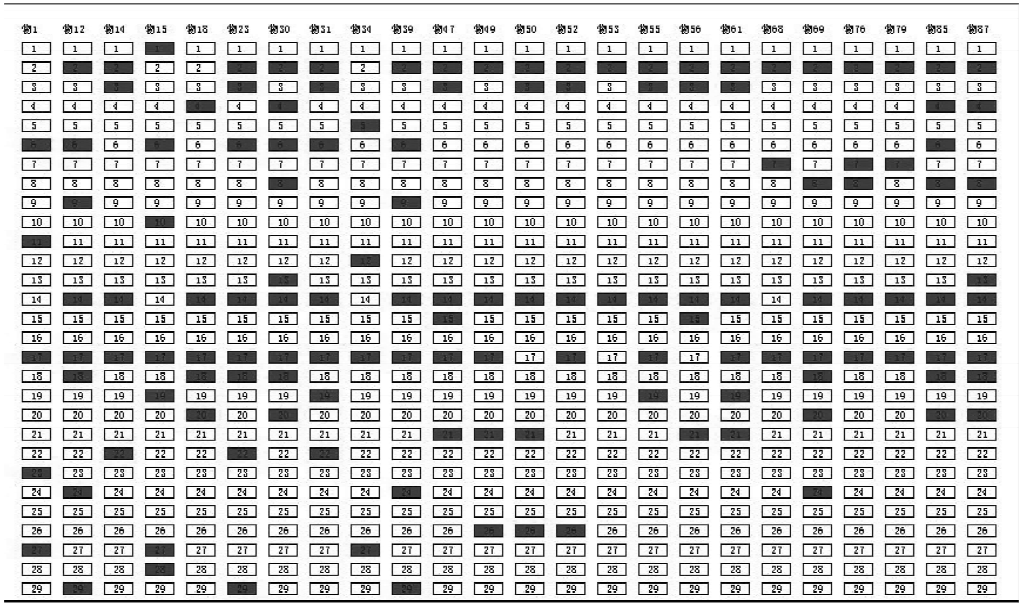


图 1 引物组合 M11E13 对 1~46 号山药资源的扩增图谱

Fig. 1 Amplification plot of *Dioscorea polystachya* Turcz. germplasm resources coded as 1 to 46 using primer combinations M11E13



物 x 表示不同山药资源编号

x represents the number of different *Dioscorea* germplasm resources

图 2 M11E10 组合所能鉴别的山药种质资源 DNA 指纹图谱

Fig. 2 DNA fingerprints of the *Dioscorea* germplasm resources identified by combination M11E10

表 4 部分山药种质资源 DNA 数字指纹图谱

Table 4 DNA digital fingerprint of some *Dioscorea polystachya* Turcz. germplasm resources

| 资源编号 | DNA 数字指纹图谱              | 资源编号 | DNA 数字指纹图谱              | 资源编号 | DNA 数字指纹图谱              |
|------|-------------------------|------|-------------------------|------|-------------------------|
| Code | DNA digital fingerprint | Code | DNA digital fingerprint | Code | DNA digital fingerprint |
| 1    | 001111001111001010110   | 32   | 101101011011011101011   | 60   | 111001111001010010010   |
| 2    | 101101011101100011011   | 33   | 001111011011011101010   | 61   | 110001111000101001001   |
| 3    | 101101001101100001101   | 34   | 001110111011010110101   | 62   | 111001111010110011010   |
| 4    | 101101001100101001110   | 35   | 101101101110101110101   | 63   | 110001111010101101010   |
| 5    | 101101101000100110010   | 36   | 001110111101111010110   | 64   | 0011100111100101111001  |
| 7    | 101101100101001001111   | 37   | 001110100111100101101   | 65   | 001110010101110011010   |
| 8    | 101101101010100111001   | 38   | 001100101010010100111   | 66   | 101101011101010010010   |
| 9    | 101101011011101100011   | 39   | 011110111010110100101   | 67   | 101101010100111001010   |
| 10   | 101101011010010010011   | 40   | 001111011010110001101   | 68   | 101101011010100010101   |
| 11   | 001111001101001010100   | 41   | 001111000110010110101   | 69   | 101101010101101011010   |
| 12   | 011100011010111010101   | 42   | 001111100011101010110   | 70   | 101101101010101011101   |
| 13   | 101101011101001110101   | 43   | 011100011110010010100   | 72   | 011110101101001101010   |
| 14   | 111001110001110001101   | 44   | 011110010100100100101   | 74   | 101101011010100111010   |
| 15   | 001110111100111000101   | 45   | 111001110010010010101   | 75   | 011110111010101001011   |
| 16   | 101101011010010001000   | 46   | 111001101101000100100   | 76   | 001110010101001001011   |
| 17   | 101101011011100010010   | 47   | 111001101010010010001   | 77   | 101101011001010010101   |
| 18   | 101101011011100110010   | 48   | 111001100100111001010   | 78   | 101101010010010101101   |
| 19   | 101101010101011010010   | 49   | 110010011100101110010   | 79   | 101101011010101001001   |
| 21   | 101101001000111100101   | 50   | 111001001010011100100   | 80   | 101101010100010100101   |
| 22   | 101101011101111001101   | 51   | 111001111001001010010   | 81   | 101101010100100101101   |
| 23   | 101101010001011111001   | 52   | 111001110011101001001   | 84   | 101101010101011010110   |
| 24   | 101101011011101010111   | 53   | 110111101011100100100   | 85   | 001110011010110101110   |
| 25   | 001111011010110010100   | 54   | 111001110101101010101   | 87   | 001110101101010101110   |
| 27   | 101101011101011101011   | 55   | 110111011100100101001   | 88   | 101101011010101101010   |
| 28   | 101101010010100101011   | 56   | 111011110101000101101   | 89   | 001110010101001110011   |
| 29   | 101101001010001101110   | 57   | 111001110110101011010   |      |                         |
| 30   | 101101010011110010010   | 58   | 111001110100100100111   |      |                         |
| 31   | 111001110011100011011   | 59   | 111000110100110100100   |      |                         |

和 ISSR 标记,SRAP 标记的特异性最好,对姬松茸菌株鉴定能力最强。单晓政等<sup>[27]</sup>利用 ISSR、SSR、RAPD 和 SRAP 标记构建不结球白菜连锁图谱时发现 SRAP 标记的稳定性好,且多态性检出效率最高,与 ISSR、RAPD 标记相比,SRAP 标记具特异性、重现性及多态性等特点。

本研究利用 SRAP 构建了山药种质资源 3 种形式的 DNA 指纹图谱,即 SRAP-PCR 扩增图谱、方框指纹图谱、数字指纹图谱。扩增图谱是分子标记时代最原始、最粗糙,也是最为基础、最为重要的 DNA 指纹图谱,是遗传多样性分析、亲缘关系分析、种质资源评价鉴定、遗传图谱绘制及其他形式 DNA 指纹

图谱构建的第一手数据资料。华树妹等<sup>[15]</sup>用 24 条 RAPD 引物得到的山药扩增图谱中,其多态性位点仅为 161 个,可鉴别出 34 份福建山药资源,平均每条 RAPD 引物鉴别 0.7 份资源。雷伏贵等<sup>[19]</sup>选用的 24 条 ISSR 引物的山药扩增图谱,共有 344 个多态性位点;吴志刚等<sup>[28]</sup>用 10 条 ISSR 引物将 20 份山药资源区分开,平均每条 ISSR 引物鉴别 2 份资源。本研究的 30 对 SRAP 引物的扩增图谱共有 581 个位点,最后挑选出的 10 对引物将 82 份山药资源鉴别开,平均每对引物能鉴别 8.2 份资源。周延清等<sup>[20]</sup>、李明军<sup>[29]</sup>、D. Petro 等<sup>[30]</sup>、T. Kondo 等<sup>[31]</sup>在不同层面上也构建了山药的扩增图谱。

与 PCR 扩增图谱相比,方框指纹图谱简洁明了地表达了多态性位点的遗传信息,在每对引物组合的方框指纹图谱中清晰表达的信息包括:该对引物组合扩增的多态性位点数、能鉴别的资源份数及资源具体编号、资源在该引物组合下所能扩增得到的多态性位点数及所处的具体位置。由于用于构建方框指纹图谱的分析软件刚开发不久,目前还处于初步运用阶段,汪斌等<sup>[32]</sup>运用该 DNA 分析软件绘制了红麻种质资源 ISSR-DNA 指纹图谱。

DNA 数字指纹图谱是每份种质资源(品种)的唯一身份证编码,可简单而有效地判别某一份资源。齐兰等<sup>[33]</sup>仅选用 2 对 SRAP 引物中的 18 条多态性条带构建起木薯 DNA 数字指纹图谱,将 18 份木薯品种区别开。李怀志等<sup>[34]</sup>用 13 个由 8 对 SRAP 引物组合扩增得到的多态性位点构建起 36 个茄子品种的指纹图谱。黄玉仙<sup>[35]</sup>用 ISSR 标记构建了本研究 90 份山药材料的 DNA 指纹图谱,但只能鉴别其中的 75 份材料,还有 15 份材料无法鉴别。本研究筛选 10 对引物组合中的 21 条多态性谱带构建的 SRAP-DNA 数字指纹图谱能鉴别出其中的 82 份山药种质资源,有 8 份资源无法鉴别,从结果来看,SRAP 适合于山药指纹图谱的构建,用不同的分子标记对同一批材料进行研究,均有部分材料无法分开,且编号 6(福建建阳 II)、83(福建长汀 I)、86(福建漳平 I)用 2 种标记都无法鉴别,这 3 份资源极有可能是重复的或其亲缘关系相当近,也有可能是所选用的引物反映的信息不够全面。

#### 参考文献

- [1] 中国植物志编委会. 中国植物志[M], 16 卷 1 分册. 北京: 科学出版社, 1985: 60-105
- [2] 聂凌鸿, 宁正祥. 山药的开发利用[J]. 中国野生植物源, 2002, 21(5): 17-19
- [3] 丁赢. 山药穿山龙[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2001: 28-29
- [4] Chun O K, Kim D O, Smith N, et al. Daily consumption of phenolics and total antioxidant capacity from fruit and vegetables in the American diet[J]. J Sci Food Agr, 2005, 85: 1715-1724
- [5] Rubatzky V E, Yamaguchi M. World vegetables: principles, production, and nutritive values[M]. New York: International Thomson Publishing, 1997: 162-182
- [6] 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
- [7] Dweck A C. The wild yam: review of *Dioscorea* species[J]. Personal Care Magazine, 2002, 3(3): 7-9
- [8] 韦本辉. 对我国淮山药研究与利用的几点意见[J]. 中国农村科技, 2012(4): 44-47
- [9] 沈程文, 宁正祥, 黄建安, 等. 基于表型参数及 SRAP 标记的广东茶种质遗传多样性[J]. 应用生态学报, 2009, 20(7): 1551-1558
- [10] Ferriol M, Pioó B, Nuez F. Morphological and molecular diversity of a collection of *Cucurbita maxima* landraces[J]. J Am Soc Hort Sci, 2004, 129(1): 60-69
- [11] 罗光佐, 施季森, 尹佟明, 等. 利用 RAPD 标记分析北美鹅掌楸与鹅掌楸种间遗传多样性[J]. 植物资源与环境学报, 2000, 9(2): 9-13
- [12] Li G, Quiros C F. Sequence related amplified polymorphism(SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction; its application to mapping and gene tagging in *Brassica* [J]. Theor Appl Genet, 2001, 103: 455-461
- [13] 王刚, 潘俊松, 李效尊, 等. 黄瓜 SRAP 遗传连锁图的构建及侧枝基因定位[J]. 中国科学 C 辑: 生命科学, 2004, 34(6): 510-516
- [14] 周生茂, 王玲平, 向珣, 等. 山药 ANS 基因的克隆和分子特性及其与花青素积累的关系[J]. 园艺学报, 2009, 36(9): 1317-1326
- [15] 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
- [16] 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
- [17] 黄姗. 山药种质资源的形态分类、SRAP 标记分析及 DNA 指纹图谱初步构建[D]. 福州: 福建农林大学, 2011: 36-38
- [18] 侯进慧, 陈宏伟, 高兆建, 等. 山药分子分类研究[J]. 徐州工程学院学报: 自然科学版, 2011, 26(4): 51-55
- [19] 雷伏贵, 华树妹, 涂前程, 等. 山药种质资源亲缘关系的 ISSR 分析[J]. 福建农业学报, 2013, 28(1): 27-32
- [20] 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
- [21] 段艳凤, 刘杰, 卜春松, 等. 中国 88 个马铃薯审定品种 SSR 指纹图谱构建与遗传多样性分析[J]. 作物学报, 2009, 35(8): 1451-1457
- [22] 孙宁, 杨付新, 付小琼, 等. 国家棉花区试新品种的 SSR 指纹图谱分析[J]. 棉花学报, 2011, 23(3): 279-283
- [23] 陈琛, 张兴桃, 程斐, 等. 秋甘蓝品种的 SSR 指纹图谱的构建[J]. 园艺学报, 2011, 38(1): 159-164
- [24] 谷凤平, 周春娥, 路淑霞, 等. 怀地黄 SRAP 分子标记体系的建立与 DNA 指纹图谱的构建[J]. 河南师范大学学报: 自然科学版, 2009, 37(3): 175-178
- [25] 雷天刚, 何永睿, 吴鑫, 等. 柑橘栽培品种(系) DNA 指纹图谱库的构建[J]. 中国农业科学, 2009, 42(8): 2852-2861
- [26] 林戎斌, 张慧, 林陈强, 等. ISSR、RAPD 和 SRAP 分子标记技术在姬松茸菌株鉴定上的应用比较[J]. 福建农业学报, 2012, 27(2): 149-152
- [27] 单晓政, 李英, 高素燕, 等. 不结球白菜分子遗传图谱的构建及分析[J]. 西北植物学报, 2009, 29(6): 1116-1121
- [28] 吴志刚, 冷春鸿, 陶正明, 等. 参薯种质遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(22): 3017-3020
- [29] 李明军. 山药种质资源的离体保存及 DNA 指纹图谱的构建[D]. 武汉: 华中农业大学, 2007: 28-30
- [30] Petro D, Onyeka T J, Etienne S, et al. An intraspecific genetic map of water yam (*Dioscorea alata* L.) based on AFLP markers and QTL analysis for anthracnose resistance [J]. Euphytica, 2011, 179: 405-416
- [31] Kondo T, Fujita T. Complete nucleotide sequence and construction of an infectious clone of Chinese yam necrotic mosaic virus suggest that macluraviruses have the smallest genome among members of the family Potyviridae [J]. Arch Virol, 2012, 157(12): 2299-2307
- [32] 汪斌, 祁伟, 兰涛, 等. 应用 ISSR 分子标记构建红麻种质资源 DNA 指纹图谱[J]. 作物学报, 2011, 37(6): 1116-1123
- [33] 齐兰, 王文泉, 张振文, 等. 利用 SRAP 标记构建 18 个木薯品种的 DNA 指纹图谱[J]. 作物学报, 2010, 36(10): 1642-1648
- [34] 李怀志, 张峻, 李翔, 等. 应用 SRAP 标记对茄子品种进行遗传多样性分析与指纹图谱构建[J]. 南京农业大学学报, 2011, 34(4): 18-22
- [35] 黄玉仙. 山药 (*Rhizoma Dioscorea*) 种质资源研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2012: 56-59