



The Molecular Identification Method for Purple Yam Cultivar Based on Genome RAPD Analysis

Liu Pangyuan, Song Shuhui, Zhao Hong, He Weiming, Wang Wenqi, Wang Huijie

National Engineering Research Center for Vegetables, Beijing, China

Email address:

liupangyuan@nercv.org (Liu Pangyuan)

To cite this article:

Liu Pangyuan, Song Shuhui, Zhao Hong, He Weiming, Wang Wenqi, Wang Huijie. The Molecular Identification Method for Purple Yam Cultivar Based on Genome RAPD Analysis. *Science Discovery*. Vol. 4, No. 3, 2016, pp. 161-164. doi: 10.11648/j.sd.20160403.11

Received: January 11, 2016; Accepted: May 16, 2016; Published: July 5, 2016

Abstract: Based on the limited understanding of the former researchers on RAPD marker, numbers of cultivars of purple yam were utilized to evaluate the application of RAPD in cultivar identification of purple yam. The results showed that RAPD was a stable DNA marker technique, and it could be scientifically and easily used in cultivar identification purple yam. The RAPD fingerprints of purple yam crops, which were derived from primers with different number of nucleotides length, were different in band number, polymorphism and band clarity. Basically, RAPD primers with S1255 can show DNA fingerprint clearly in purple yam for the generation, while RAPD primers with S1255 is more suitable purple yam crops.

Keywords: Purple Yam, RAPD, Cultivar Identification

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, 宋曙辉, 赵泓, 何伟明, 王文琪, 王慧杰

北京市农林科学院蔬菜研究中心, 北京, 中国

邮箱

liupangyuan@nercv.org (刘庞源)

摘要: 针对RAPD技术的特点及其实际应用中易出现稳定性的问题, 本研究以来自中国不同地区八种紫山药的不同品种为试材, 对RAPD技术在鉴定紫山药品种中的科学性进行了技术上的验证与分析。结果表明理想的反应条件能够保证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分子标记技术。不同长度的引物的RAPD技术在几种紫山药品种鉴定中体现出谱带清晰度以及数量等方面不同的特点。其中碱基数为S1255的引物在紫山药上的多态性较高且谱带清晰, 以此为基础作为鉴定紫山药的不同品种。

关键词: 紫山药, RAPD, 品种鉴定

1. 引言

紫山药 (*Dioscorea alata* L.), 又名大薯、参薯、脚板薯、紫蒟药、紫淮山。原产亚洲热带地区, 属草本蔓生性植物, 薯蓣科薯蓣属参薯种食用植物。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的植物, 中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, 对其研究还很有限。最早记载有薯蓣的中国最早的一部药物学著作“神农本草经”中对山药就有记载, 被列为上品, 可药食兼用的材料。到明李时珍的“本草纲目”中仍然没有明确的将两种植物分开, 仍然统称山药。

先期进行的一些研究表明，紫山药其营养及药用价值除具有普通山药的优点外，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、极具营养价值食品高度喜爱。表明紫山药有潜在的开发价值，既可作为蔬菜来食用，又可以像怀山药作为一种温和的药材。

紫山药是一种适宜短日照生长环境下生长的植物，是一种喜温类植物，主要分布在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。

紫山药因其肉质红中带紫而得名。紫山药块茎肥大，单个块茎重500克左右，最大达到2500多克，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、营养成份分析等商品化指标在全省、全国的山药中首屈一指。

紫山药的药用价值很高，既可作餐桌上的佳肴，又可作保健药材，据《本草纲目》记载，经常食用紫山药，可以降低血压、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，南方种植紫山药的品种也有多种，都统称为紫山药，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急需解决的问题。研究表明紫山药品种之间在分子水平上存在着显著差异，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。因此，对紫山药进行遗传分析具有重要意义。

本研究提供了一种基于基因组RAPD分析的紫山药常规品种分子鉴定方法。

2. 材料与方法

2.1. 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，请参见表1。

随机引物购自上海生工生物工程公司，2×EasyTaq PCR SuperMix和DNA分子量标准Trans5K DNA Marker购于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

2.2. 取样及样品处理

采用正常生长的紫山药品种，每个品种10株，每株10片新鲜幼叶放入冰盒，置于-40℃超低温冰箱中储存24h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；

2.3. DNA提取及其纯度和浓度监测

以幼叶干粉为材料，取0.2g，采用改良2×CTAB（提取缓冲液）提取总DNA，使用0.8w%琼脂糖对所获基因组DNA的纯度进行检测，利用蛋白核酸定量测定仪检测DNA浓度。

2.3.1. 2×CTAB的配制方法

缓冲液配置的成分及浓度

成分	浓度
Tris-HCl缓冲液（pH8.0）	100 mmol/L
EDTA-Na ₂ （EDTA二钠）（pH8.0）	20 mmol/L
NaCl	1.4 mol/L
CTAB	20 g/L
DNA提取前加入β-巯基乙醇	2 ml/L

表中显示2×CTAB（提取缓冲液）的成分，按照这些成分配置相应浓度，达到使用目的。

2.3.2. DNA提取方法

(1)取6ml预热到60℃的2×CTAB溶液于装有0.2g叶片粉末的离心管中，60℃水浴30分钟，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6ml氯仿-异戊醇（体积比24：1），置于摇床上30分钟充分混匀；(3)12000rpm离心10分钟；(4)将上清液转入新的离心管中，加入2倍体积预冷（-20℃）无水乙醇，混匀，在-20℃冰箱中放30分钟，使核酸沉淀成絮状；(5)室温下12000 rpm离心10分钟；(6)弃上清，DNA沉淀风干后，溶解于800 μl去离子水中，作为PCR模板DNA，-20℃保存备用；使用0.8w%琼脂糖对所获基因组DNA的纯度进行检测，利用蛋白核酸定量测定仪检测DNA浓度。使用Thermo公司NANODROP 2000微量分光光度计直接测得DNA浓度，OD260/280的比值在1.8-2.0之间，OD260/230的比值在2.0-2.5之间，DNA浓度大于10 mg/ml。

2.4. 引物筛选和RAPD分析

在对紫山药进行RAPD分析的PCR扩增体系优化——对DNA模板量从5 ng，10 ng，20 ng，40 ng，60 ng，80 ng，100 ng 进行优化，最总选择20 ng。然后，选取八个（表1）在形态上差异比较大的紫山药品种进行RAPD 130个引物（见表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。

表2 130个随机引物编号及序列。

序号	引物编号	系列	序号	引物编号	系列
1	S1001	TCCGCAACCA	66	S1266	TCTCTAGGGG
2	S1002	CACTTCCGCT	67	S1267	AGACCCCTTG
3	S1003	GGTTACTGCC	68	S1268	CACCGATCCA
4	S1004	CTCCCCAGAC	69	S1269	ACGGCCAATC
5	S1005	TTGCAGGCAG	70	S1270	GGCGTATGGT
6	S1006	GTAAGCCCT	71	S1271	CTTCTCGGTC
7	S1007	CCCTACGGAG	72	S1272	CCACTCGTGT
8	S1008	TTCCCGTGCC	73	S1273	CCAAGCACAC
9	S1009	AGAACCAGAG	74	S1274	CACCTCGACC
10	S1010	GGGATGACCA	75	S1275	TGCTGACGAC
11	S1011	TCCGCTGAGA	76	S1276	TCTTAGGCGG
12	S1012	TCCAACGGCT	77	S1277	TTGGCATCCC
13	S1013	TGAGTCCGCA	78	S1278	CACCACTAGG
14	S1014	TGTGGCCGAA	79	S1279	AGCCTGGGGA
15	S1015	CTACAGCGAG	80	S1280	GTCGAAACCC
16	S1016	CAAGGTGGGT	81	S1321	GTGTGCGGTT
17	S1017	CAGTGGGGAG	82	S1322	GGGAGGCAAA
18	S1018	GGGCTAGTCA	83	S1323	CCAAGAGGCT
19	S1019	GGCAGTTCTC	84	S1324	TCCCCAGGAG
20	S1020	GGAAGGTGAG	85	S1325	AGTGCACACC
21	S1021	GGCATCGGCT	86	S1326	AGGCATCGTG
22	S1022	AGCCGTTTCA	87	S1327	ACGCGACAGA
23	S1023	GGGTCCAAAG	88	S1328	AGTATGGCGG
24	S1024	CTATCCTGCC	89	S1329	GGAAGTCTCT
25	S1025	GTCTAGCGG	90	S1330	CCAGGCTGAC
26	S1026	TGCCGCACTT	91	S1331	TGATTGCGGG
27	S1027	ACGAGCATGG	92	S1332	GGTCGGGTCA
28	S1028	AAGCCCCCA	93	S1333	GAGCACTGCT
29	S1029	TCGCTGGTGT	94	S1334	CACGGGCTTG
30	S1030	TCGGGGCATC	95	S1335	CAGCAATCCC
31	S1031	ACGGCGATGA	96	S1336	GTCTGTGCGG
32	S1032	GACGCGAACC	97	S1337	TGGGCTCTGG
33	S1033	ACGTGCGAC	98	S1338	GTGTGCAGTG
34	S1034	TGGTGCATC	99	S1339	CCCTGTCGCA
35	S1035	GACACAGCCC	100	S1340	ACACTCGGCA
36	S1036	AAGCAGCAG	101	S1341	GTCCACCTCT
37	S1037	CCTCACGTCC	102	S1342	TGCGAAGGCT
38	S1038	TCGCGGAACC	103	S1343	TTTCCGGGAG
39	S1039	GGCAAAGCTG	104	S1344	AAGGCTCGAC
40	S1040	CCTGTTCCCT	105	S1345	TCGCTGCGTT
41	S1241	CAGTGGTTCC	106	S1346	GGCTTCGCAA
42	S1242	CAGGTCTAGG	107	S1347	GACCGTCTGT
43	S1243	GACTGGGAGG	108	S1348	AGGCTTCCCT
44	S1244	TTGCCTCGCC	109	S1349	CCGATCCAAC
45	S1245	ACACCTGCCA	110	S1350	CAAGGCCCT
46	S1246	CCGTCCCTGA	111	S1351	ACGCGCCTTC
47	S1247	ACTGCGACCA	112	S1352	CTGTGCGCGT
48	S1248	TCCTCGTGGG	113	S1353	CCGCTCGTAA
49	S1249	CCGTTAGCGT	114	S1354	GGTGGGTAGA
50	S1250	ACCTCCGGTC	115	S1355	CCAAGAGGCA
51	S1251	CCAGATCTCC	116	S1356	GGTGTGGTTC
52	S1252	CTGCCTAGCC	117	S1357	GGTGATTCGG
53	S1253	CTGGTGGAAG	118	S1358	ACCCCAACCA
54	S1254	GTGCCGCACT	119	S1359	AACTTGCCCC
55	S1255	TGACGCACGG	120	S1360	TCATTGCCCC
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	TCGCTCGTAG

序号	引物编号	系列	序号	引物编号	系列
64	S1264	GGCTTCTGTC	129	S1369	CCTTGACCCC
65	S1265	GAGTACCGT	130	S1370	ACTCTGGGGA

8个紫山药品种采用S1255引物，在Gene Amp PCR System 9700PCR扩增仪上进行DNA扩增。采用20 μL反应体系进行PCR扩增，反应体系总体积为20 μL，含10 μL 2×EasyTag PCR SuperMix(+dye) (北京全式金生物技术有限公司)+2 μL 5mM引物+20ng DNA。

PCR反应程序为：94℃预变性5min 30s；接着94℃变性1min 30s，40℃复性1min，72℃延伸2min，40个循环；最后72℃后延伸10min。

扩增产物用1.6w%、含1v% Golden view 的琼脂糖凝胶电泳分离2-3h，电压为6V/cm；在UV光下检测扩增结果并通过凝胶成像系统 (Gel Doc XR⁺)照相，分别得到8种紫山药的随机扩增多态DNA标准图谱 (图1)。

3. 结果与分析

每个引物扩增产生了一种特有RAPD指纹图谱，如图1是用S1255引物扩增的RAPD指纹图谱，图中从左至右的图谱编号分别为M和1-8，其中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。对于每个供试紫山药品种的5个重复个体而言，引物S1255分别扩增产生相一致的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，可以看到S1255引物扩增出的特有DNA指纹，8种紫山药品种扩增图谱相互之间有明显不同，可以同时区分出8种紫山药品种。

紫山药品种在中国还有很多，目前收集品种还不完全，还不能鉴定全部的紫山药品种，只能给现在种植面积较大的主要品种提供一个方便的鉴定方法，此方法还有一定的局限性，有待经一部提高。

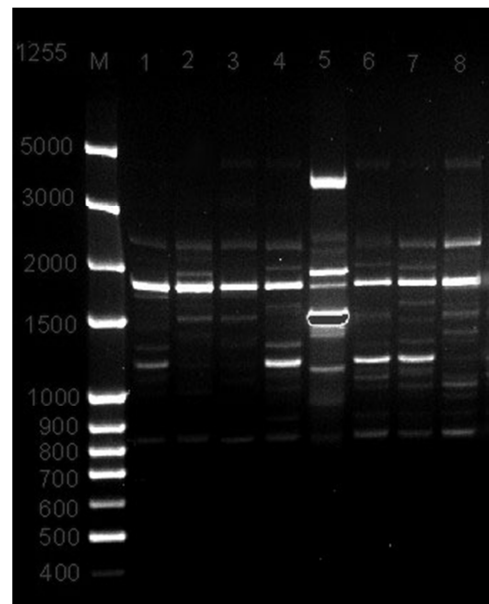


图1 8个紫山药品种采用引物S1255 (TGACGCACGG) 扩增的RAPD标准图谱。

4. 鉴定方法的应用

将待鉴定的紫山药品种按照上述步骤进行分析，得到所需要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图谱与标准图谱比较判定，可以判断是否为某种紫山药品种，对紫山药生产提供品种选择的准确性，确保紫山药生产的利益。

实例：待鉴定紫山药为从云南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（具体步骤同前面所述），如图2所示，图中从左至右的图谱编号分别为M、1-8和9，其中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。经过RAPD指纹图谱鉴定比较，判断待鉴定紫山药（9号）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。

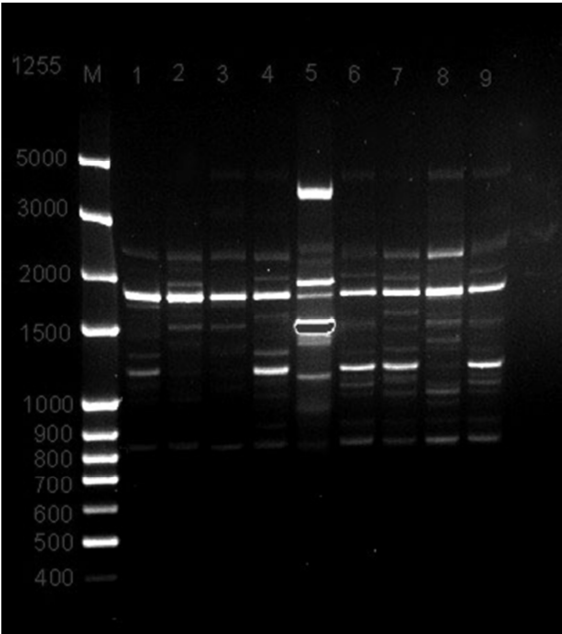


图2 8个紫山药品种及待鉴定紫山药采用引物S1255（TGACGCACGG）扩增的RAPD图谱。

参考文献

[1] An N, Guo H B, KEW D. Genetic Variation in Rhizome Lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn. ssp. *nucifera*) Germplasms from China Assessed by RAPD Markers [J]. *Agricultural Sciences in China*, 2009, 8(1): 31~39.

[2] Yang RW, Zhou YH, Ding C B, et al *Biologia Plantarum*, Relationships among *Leymus* species assessed by RAPD markers [J]. *Biologia Plantarum*, 2008, 52(2): 237~241.

[3] Wang Y J, Lu JN. The research on RAPD genetic markers of grape seedlessness gene [J]. *Journal of Northwest A & F University Na. t Sc. i Ed.*, 1996, 5(24): 10~20.

[4] Williams JG K, KubelikA R, Livak. J, et a.l DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. *Nucl Acids Res*, 1990, 18: 6531~6535.

[5] Lin KH, Lai Y C, Li H C. Genetic variation and its relationship to rootweight 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。