

赵 圆,张艳芳,杨 帆,等. 基于形态标记和 AFLP 标记的山药种质资源遗传多样性分析[J]. 江苏农业科学,2023,51(6):47-54.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2023.06.007

基于形态标记和 AFLP 标记的山药种质资源遗传多样性分析

赵 圆,张艳芳,杨 帆,赵令敏,陈 妍,霍秀文

(内蒙古农业大学园艺与植物保护学院/内蒙古自治区野生特有蔬菜种质资源与种质创新重点实验室,内蒙古呼和浩特 010019)

摘要:为研究山药种质资源的遗传多样性及亲缘关系,采用 AFLP 分子标记结合形态标记的方法,对 60 份山药种质资源进行遗传多样性分析。结果表明,60 份山药种质资源形态性状间具有较高的多样性,遗传多样性指数最高的是叶形,变异系数最大的是块茎质量;通过聚类分析计算出欧氏距离在 1.081 6 ~ 11.425 9 之间,当遗传距离为 8.18 时可将供试材料分为两大类。筛选出的 26 对 AFLP 引物组合扩增出多态性条带 580 条,平均多态率 78.44%;Nei's 基因多样性指数平均值为 0.198 8;Shannon 信息指数平均值为 0.314 9,表明供试山药种质有较高的遗传多样性;遗传相似系数在 0.619 ~ 0.922,在遗传相似系数为 0.74 时,可将 60 份山药种质分为 2 个类群和 2 个单独分支,结果表明,不同地区来源的山药种质在聚类图中没有明显界限。部分供试材料的形态标记与 AFLP 标记聚类结果具有一致性,但也存在一定差异。山药种质资源遗传多样性丰富,将形态学与分子标记结合能有效鉴别种质资源及其亲缘关系。

关键词:山药;形态标记;AFLP 分子标记;遗传多样性

中图分类号:S632.102.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2023)06-0047-08

山药(*Dioscorea opposita* Thunb.)为合目薯蓣科薯蓣属,具备双子叶特征特性的单子叶缠绕草质藤本植物,无性繁殖。山药的主要产品器官为子叶下胚轴膨大形成的地下块茎,其地下块茎形状呈长圆柱形,垂直生长^[1]。山药是纯天然的滋补保健食品,含有多种营养物质,可食用,也可药用,有调节脾胃、增强免疫、延缓衰老等效果,是世界上重要的

十大食用块茎类植物之一^[2]。我国是山药重要的原产地之一,在长期栽培过程中,因其适应性强、种植范围广,使得地区间相互引种,但山药的体外培养和遗传转化方案尚未建立,导致山药原有遗传基础已无法准确溯源,种质资源混乱,仅通过简单形态学标记很难真实反映品种间的遗传背景和亲缘关系,分类鉴定难度大,不利于山药产业的健康快速发展^[3]。

以 DNA 为基础的分子标记是鉴定种质资源差异性最直接有效的遗传分析方法,不受基因表达和地理环境的影响。其中,AFLP 是基于 PCR 开发且效率很高的标记技术,只需少量纯化的 DNA,具有重复性好、稳定性强、灵敏度高等优点,极大地加快了育种进程^[4]。许云等通过 AFLP 分子标记分析了

收稿日期:2022-03-24

基金项目:国家自然科学基金(编号:31860558);内蒙古自治区科技计划项目(编号:2020GG0044)。

作者简介:赵 圆(1998—),女,内蒙古呼和浩特人,硕士,从事蔬菜种质资源和生物技术等研究工作。E-mail:1518576512@qq.com。

通信作者:霍秀文,博士,教授,博士生导师,从事蔬菜种质资源和生物技术等研究工作。E-mail:huoxiuwen@imau.edu.cn。

[33] Aird D, Ross M G, Chen W S, et al. Analyzing and minimizing PCR amplification bias in Illumina sequencing libraries [J]. *Genome Biology*, 2011, 12(2): 1-14.

[34] 张永德,文露婷,罗洪林,等. 卵形鲳鲹基因组调研及其 SSR 分子标记的开发应用 [J]. *南方农业学报*, 2020, 51(5): 983-994.

[35] 卢玮筱,陈永霞,祁鹏志. 扁玉螺转录组 SSR 信息分析 [J]. *浙江海洋大学学报(自然科学版)*, 2018, 37(3): 215-220.

[36] Hung K H, Chiang T Y, Chui C T, et al. Isolation and characterization of microsatellite loci from a potential biofuel plant

Miscanthus sinensis (Poaceae) [J]. *Conservation Genetics*, 2008, 9(6): 1377-1380.

[37] Ma K H, Kim N S, Lee G A, et al. Development of SSR markers for studies of diversity in the genus *Fagopyrum* [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2009, 119(7): 1247-1254.

[38] 熊 钢,王晓清,王 佩,等. 泥东风螺 EST-SSR 开发及其群体遗传多样性分析 [J]. *渔业科学进展*, 2020, 41(4): 117-124.

[39] 曾 聪,高泽霞,罗 伟,等. 基于 454GS FLX 高通量测序的团头鲂 ESTs 中微卫星特征分析 [J]. *水生生物学报*, 2013, 37(5): 982-988.

111 份大薯材料的遗传多样性,8 对引物组合共扩增出 1 286 个多态性位点,占总位点数的 99.61%,表明 AFLP 标记可以检测出大薯较高的多态性,有效地分析材料间的遗传关系^[5]。Mengesha 等采用 AFLP 基因指纹图谱对 43 株不同群体的几内亚山药进行鉴定,分析发现,几内亚山药栽培品种间存在种内高度变异和种间低程度变异^[6]。王丹等对 21 份马铃薯材料进行 AFLP 分析,并构建了能区分所有材料的指纹图谱^[7]。本研究通过 AFLP 分子标记结合形态标记的方式,对 60 份山药种质资源进行聚类及遗传多样性分析,以进一步揭示山药种质资源遗传多样性及亲缘关系,以期为今后山药种质资源的分类及优良品种的选育提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与来源

供试材料为笔者所在课题组近年从河南省、河北省、山东省等山药主产区收集到的 60 份山药种质资源,均种植于内蒙古呼和浩特市内蒙古农业大学种质资源圃,土质疏松,无石块,肥力适中,无连作。山药种质基本信息见表 1。

1.2 试验方法

1.2.1 主要形态指标调查 按照山药的生物学特性,在山药生长发育旺盛期和收获期,分别观察、计算山药植株的地上部和地下部形态特征指标,具体参照许念芳等的测定方法^[8]。形态多样性调查的

表 1 供试山药材料编号及来源

编号	名称	来源地	编号	名称	来源地
1	北洋山药(<i>D. opposita</i> Beiyang)	山西省晋中市	31	日本山药-3(<i>D. japonica</i> -3)	日本
2	河南焦作山药(<i>D. opposita</i> Henanjiaozuo)	河南省焦作市	32	河南山药-2(<i>D. opposita</i> Henan-2)	河南省
3	温县铁棍山药-1(<i>D. opposita</i> Tiegun-1)	山东省济南市	33	淮山药(<i>D. opposita</i>)	河南省
4	麻山药-1(<i>D. opposita</i> Ma-1)	河北省	34	河南铁棍-2(<i>D. opposita</i> Henantiegun-2)	河南省
5	海口山药(<i>Dioscorea</i> Haikou)	海南省海口市	35	嘉祥细毛山药-2(<i>D. opposita</i> Jiexiangximao-2)	山东省嘉祥县
6	日本山药-2(<i>D. japonica</i> -2)	日本	36	河南铁棍-6 <i>D. opposita</i> (Henantiegun-6)	河南省
7	河南山药-1(<i>D. opposita</i> Henan-1)	河南省	37	云南富民山药(<i>Dioscorea</i> Yunnanfumin)	云南省富民县
8	细毛山药(<i>D. opposita</i> Ximao)	山东省	38	永丰淮山药(<i>D. opposita</i> Yongfeng)	江西省永丰县
9	大和长芋-2(<i>D. opposita</i> Dahechangyu-2)	陕西省	39	草河口山药(<i>D. opposita</i> Caohekou)	辽宁省沈阳市
10	广淮(<i>D. fordii</i>)	广东省	40	河南铁棍-3(<i>D. opposita</i> Henantiegun-3)	河南省
11	西施山药(<i>D. opposita</i> Xishi)	山东省	41	毕克齐山药(<i>D. opposita</i> Bikeqi)	内蒙古呼和浩特市
12	安平白山药(<i>D. opposita</i> Anpingbai)	河北省	42	铁棍山药(<i>D. opposita</i> Tiegun)	河南省
13	太谷山药-1(<i>D. opposita</i> Taigu-1)	山西省晋中市太谷区	43	麻山药-2(<i>D. opposita</i> Ma-2)	河北省
14	江西永丰山药(<i>D. opposita</i> Jiangxiyongfeng)	江西省永丰县	44	河南铁棍-4(<i>D. opposita</i> Henantiegun-4)	河南省
15	河南铁棍-1(<i>D. opposita</i> Henantiegun-1)	河南省	45	陕西麻山药(<i>D. opposita</i> -Shanxima)	陕西省
16	细毛长山药(<i>D. opposita</i> Ximaochang)	山东省	46	会泽山药(<i>Dioscorea</i> Huize)	云南省会泽县
17	嘉祥细毛山药-1(<i>D. opposita</i> Jiexiangximao-1)	山东省嘉祥县	47	小白嘴(<i>D. opposita</i> Xiaobaizui)	河北省
18	陕西铁棍(<i>D. opposita</i> Shanxitiegun)	陕西省	48	保定山药(<i>D. opposita</i> Baoding)	河北省保定市
19	河北山药(<i>D. opposita</i> Hebei)	河北省	49	播乐赖皮山药(<i>Dioscorea</i> Bolelaipi)	云南省
20	罗次山药(<i>D. opposita</i> Luoci)	云南省	50	太怀山药(<i>D. opposita</i> Taihuai)	山西晋中市太谷区
21	大和长芋-3(<i>D. opposita</i> Dahechangyu-3)	河北省	51	焦作铁棍山药(<i>D. opposita</i> Jiaozuotiegun)	河南省焦作市
22	大和长芋(<i>D. opposita</i> Dahechangyu)	河北省	52	邹平混杂长山药(<i>D. opposita</i> Hunzhang)	山东省邹平市
23	罗家营山药(<i>D. opposita</i> Luojiaying)	内蒙古呼和浩特市罗家营村	53	华县山药(<i>D. opposita</i> Huaxian)	陕西省华县
24	贵州安顺山药(<i>D. opposita</i> Guizhouanshun)	贵州省安顺市	54	贵州山药(<i>D. opposita</i> Guizhou)	贵州省
25	南城淮山(<i>D. opposita</i> Huaishan)	江西省南城	55	温县铁棍山药-2(<i>D. opposita</i> Tiegun-2)	河南省温县
26	黄皮山药(<i>D. opposita</i> Huangpi)	河北省	56	双胞胎(<i>D. opposita</i> Shuangbao)	河北省
27	江西山药(<i>D. opposita</i> Jiangxi)	江西省	57	得泽红皮山药(<i>Dioscorea</i> Dezhongpi)	云南省
28	四川山药(<i>D. opposita</i> Sichuang)	四川省	58	太谷山药-2(<i>D. opposita</i> Taigu-2)	山西省晋中市太谷区
29	曲靖山药(<i>Dioscorea</i> Qujing)	云南省曲靖市	59	山西山药(<i>D. opposita</i> Shanxi)	山西省侯马市
30	泰和山药(<i>D. opposita</i> Taihe)	江西省泰和县	60	甘肃山药(<i>D. opposita</i> Gansu)	甘肃省

主要指标及赋值标准见表 2。

1.2.2 DNA 提取 2020 年 8 月采集生长旺盛期健康、无病虫害的山药幼嫩叶片,装入事先准备好的冻存管,迅速放入装有液氮的采样盒中,保持叶片新鲜,采集后立即进行 DNA 提取。山药 DNA 的提

取和浓度检测详见张佳佳等的方法^[9]。

1.2.3 主要试剂及引物 参考孙瑞芬等的方法^[10]设计接头和引物序列(表 3)。选择性扩增引物由预扩增引物 *EcoR* I 和 *Mse* I 序列末端加任意的 3 个碱基组成,各设计 16 个,共组合 256 对。

表 2 形态多样性指标及赋值标准

编号	性状	描述标准	编号	性状	描述标准
1	茎蔓旋转	1:左旋,2:右旋	12	植株长势	1:强,2:中,3:弱
2	茎蔓颜色	1:绿色,2:紫色	13	零余子有无	1:有,2:无
3	茎蔓截面形状	1:圆形,2:方形	14	块茎直径	10 株平均块茎直径(cm)
4	叶柄颜色	1:紫,2:绿	15	块茎质量	10 株平均块茎质量(kg)
5	叶的缺裂	1:浅裂,2:中裂,3:深裂,4:全缘	16	块茎长	10 株平均块茎长度(cm)
6	叶形	1:戟形,2:卵形,3:心形,4:三角形	17	块茎形状	1:圆柱状,2:扁柱状,3:棍状,4:块状
7	叶色	1:深绿,2:浅绿	18	块茎表皮颜色	1:白色,2:紫色,3:红褐色,4:黄褐色
8	叶长	30 张叶片平均叶长(cm)	19	块茎肉色	1:白,2:淡黄色,3:紫色
9	叶宽	30 张叶片平均叶宽(cm)	20	块茎龙头特征	1:细长,2:短粗,3:无
10	叶柄长	30 张叶片平均叶柄长(cm)	21	块茎须根数	1:少(1~100),2:多(100 以上),3:无
11	是否开花	1:否,2:是			

表 3 接头和引物序列

接头/引物	编号	序列(5'→3')
<i>EcoR</i> I 接头	E1	CTCGTAGACTGCGTACC
	E2	AATTGGTACGCAGTC
<i>Mse</i> I 接头	M1	GACGATGAGTCCTGAG
	M2	TACTCAGGACTCAT
预扩增引物	E0	GACTGCGTACCAATTC
	M0	GATGAGTCTGTAGTAA

1.2.4 AFLP 扩增及检测 首先选用 3 个山药品种(海口山药、日本山药-2、河南山药-1)进行引物筛选,从 256 对引物中筛选出多态性较好的引物组合,然后进行 60 份材料的整体试验。

1.2.4.1 酶切与连接 选用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Mse* I 对植物组 DNA 进行双酶切,酶切体系为:10 × NEB Buffer 5 μL, *EcoR* I / *Mse* I 2 μL, 模板 DNA 1 μg, 补 ddH₂O 至 50 μL。PCR 程序为 37 °C 温育 10 min, 65 °C 温育 20 min。

分别制备 *EcoR* I 接头和 *Mse* I 接头:将 E1 (10 μmol/L) 和 E2 (10 μmol/L) 各 10 μL 于微量离心管中混匀,取另一离心管将 M1 (10 μmol/L) 和 M2 (10 μmol/L) 各 10 μL 混匀。PCR 程序均为 95 °C 5 min, 65 °C 10 min, 37 °C 10 min, 25 °C 10 min, 4 °C 20 min。

连接体系为 20 μL: T₄ DNA Ligation Buffer

2 μL, T₄ DNA Ligase (3 U/μL) 0.5 μL, *EcoR* I 接头/*Mse* I 接头 2 μL, 酶切产物 10 μL, ddH₂O 5.5 μL。16 °C 连接过夜。

1.2.4.2 预扩增 将连接产物稀释 10 倍作为预扩增模板,预扩增反应体系 20 μL: *rTaq* 酶 10 μL, MO/E0 2 μL, 10 × 连接产物 2 μL, ddH₂O 6 μL。PCR 程序为:94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 60 s, 72 °C 延伸 60 s, 30 次循环; 72 °C 延伸 10 min。

1.2.4.3 选择性扩增 参照王志敏等对山药块茎不同发育时期相关差异基因的 cDNA - AFLP 分析中的反应体系及反应条件^[11]进行选择性扩增。

1.2.4.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳及银染 选择性扩增产物 95 °C 变性后经过 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,强碱法银染显色至出现清晰条带,拍照保存,统计条带。

1.2.5 数据处理与分析 利用 SPSS 25.0 软件计算 15 个质量性状的分布频率; 6 个数量性状的最小值、最大值、平均值、标准差、变异系数; 参照吴金平等的方法^[12]计算 Shannon - Wiener 多样性指数。采用 DPS 分析软件中非加权类平均法对 60 份山药种质进行 Q 型聚类分析,从中分析各材料的亲缘关系。根据 AFLP 扩增条带,构建“0、1”矩阵(有带为 1,无带为 0),利用 POPGEN 32 软件统计多态性条带数、有效等位基因数 (N_e)、Shannon 信息指数 (I) 等遗传多样性指数。使用 NTSYS 2.1 软件计算不

同材料间的遗传相似性系数,并根据遗传相似系数用UPGMA法进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 山药种质资源形态性状多样性

对60份山药种质资源的21个性状进行分析,不同性状在不同材料间表现出不同的多样性。由表4可知,在15个质量性状中,除叶的缺裂均为浅裂外,其他14个质量性状在不同级别上分布不均匀,遗传多样性指数最高的是叶形,为1.2739,其次为叶色(1.0000)。由表4可知,茎蔓以右旋为主;茎蔓颜色以紫色为主;茎蔓截面形状以圆形为主;叶形多为戟形、心形;植株长势中等;大多数无零余子;块茎形状以棍状为主;块茎表皮颜色以黄褐色为主;块茎肉色多为白色;块茎龙头多为细长型;块茎须根数100以上。由表5可知,6个数量性状具有不同差异,块茎质量的变异系数最大,达到75.88%,叶长变异系数最小,为12.43%。各数量性状变异程度为块茎质量 > 块茎直径 > 叶柄长 > 块茎长 > 叶宽 > 叶长。

表4 15个质量性状的分布及多样性指数

性状	频率分布				遗传多样性指数 H'
	1	2	3	4	
茎蔓旋转	5.0	95.0	—	—	0.286 4
茎蔓颜色	16.7	83.3	—	—	0.650 8
茎蔓截面形状	96.7	3.3	—	—	0.209 2
叶柄颜色	48.3	51.7	—	—	0.999 2
叶的缺裂	100	0.0	—	—	0.000 0
叶形	53.3	0.0	40.0	6.7	1.273 9
叶色	50.0	50.0	—	—	1.000 0
是否开花	60.0	40.0	—	—	0.971 0
植株长势	5.0	83.3	11.7	—	0.797 8
零余子有无	28.3	71.7	—	—	0.859 5
块茎形状	21.7	0.0	78.3	—	0.754 7
块茎表皮颜色	8.3	0.0	1.7	90.0	0.534 8
块茎肉色	86.7	13.3	—	—	0.565 6
块茎龙头特征	76.7	23.3	—	—	0.783 2
块茎须根数	25.0	73.3	1.7	—	0.928 4

2.2 山药种质资源形态性状的聚类分析

对60份山药种质的田间形态数据进行系统聚类分析,结果如图1所示。60份山药种质的欧氏距离为1.0816~11.4259,说明所选材料的遗传多样性丰富。其中日本山药-2(6)和日本山药-3(31)之间遗传距离最小,为1.0816,两者间遗传差异相

表5 6个数量性状的统计分析

性状	最大值	最小值	平均值	标准差	变异系数 (%)
叶长(cm)	10.05	5.17	6.99	0.87	12.43
叶宽(cm)	6.38	2.99	4.43	0.75	16.86
叶柄长(cm)	4.58	1.79	2.73	0.54	19.61
块茎直径(cm)	6.62	1.28	2.85	1.06	37.14
块茎质量(kg)	0.71	0.03	0.19	0.15	75.88
块茎长(cm)	59.80	23.47	45.15	8.36	18.52

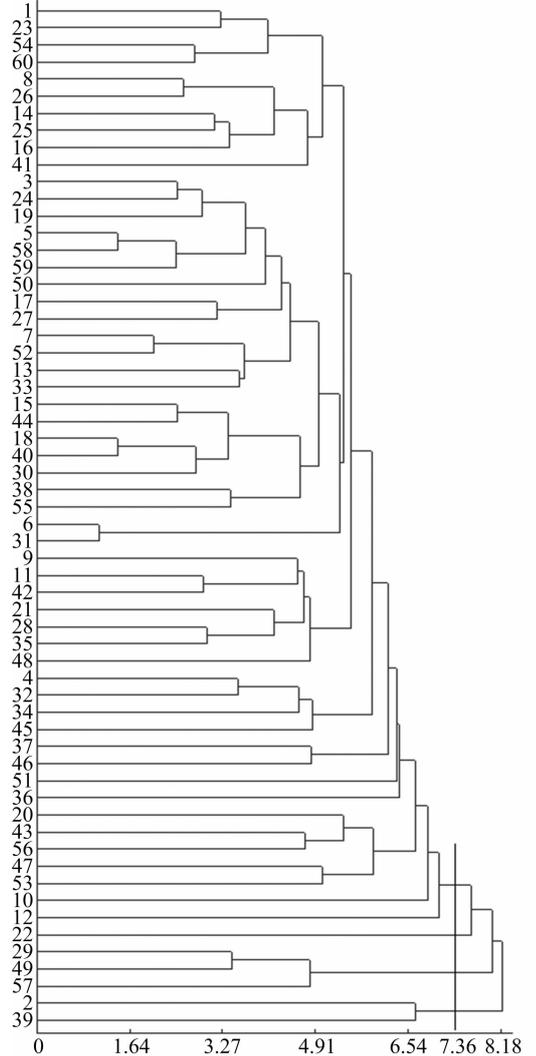


图1 60份山药材料形态性状的聚类分析结果

对较小;大和长芋(22)和得泽红皮山药(57)之间遗传距离最大,为11.4259,两者间遗传差异相对较大。当遗传距离为8.18时可将供试材料分为两大类,河南焦作山药(2)和沈阳草河口山药(39)聚为一类,其他58份种质聚为一类,这2份种质的主要特征为茎蔓截面形状为方形,而其他材料均为圆

形。当遗传距离在 7.36 时可将供试材料分为 3 个类群和一个单独分支,大和长芋(22)单独聚为一类,其主要特征为叶形较大、植株长势强、有零余子、块茎短粗产量高;云南品种曲靖山药(29)、播乐赖皮山药(49)、德泽红皮山药(57)聚为第一亚类,主要特征为茎蔓左旋、叶柄绿色、叶片为浅绿色心形、无零余子、块茎表皮白色、薯肉白色、须根数 100 以上;其余材料聚为第二亚类。

2.3 AFLP 扩增结果分析

选用 3 个山药品种从 256 对引物中筛选出 26 对清晰且多态性较好的引物组合(表 6),分别对 60 份材料进行选择性的扩增,共获得多态性条带 580 条,平均每对引物扩增 22 条多态性条带,片段大小主要集中在 100 ~ 750 bp 之间,平均多态率 78.44%,其

中扩增条带数最多的引物组合是 E - GCT/M - GAC;扩增条带数最少的引物组合是 E - GCT/M - TGC。扩增多态率最高的是引物组合 E - GCT/M - ACG,达到 97.50%;扩增多态率最低的是引物组合 E - CAG/M - AGT,为 62.96%。Nei's 基因多样性指数在 0.111 5 ~ 0.335 5 之间,平均值为 0.198 8;Shannon 信息指数在 0.188 7 ~ 0.503 9 之间,平均值为 0.314 9,表明供试山药种质具有较高的遗传多样性。图 2 为引物组合 E - GTT/M - TTC 扩增后的聚丙烯酰胺凝胶电泳检测图。

2.4 聚类分析

采用 NTSYS2.1.0 软件计算 60 份山药种质的遗传相似系数,用 UPGMA 法进行聚类分析(图 3)。60 份山药材料之间遗传相似系数为 0.619 ~ 0.922,

表 6 26 对引物组合扩增产物多态性分析

引物组合	扩增条带数 (条)	多态性条带数 (条)	多态率 (%)	观察等位 基因数(个)	有效等位 基因数(个)	Nei's 基因多样性 指数 H	Shannon 信息指数 I
E - CGA/M - TAC	29	23	79.31	1.793 1	1.317 1	0.201 9	0.318 6
E - TAC/M - CTT	27	21	77.78	1.777 8	1.195 3	0.134 2	0.231 0
E - AGC/M - CTT	36	28	77.78	1.777 8	1.224 3	0.155 9	0.261 2
E - TCG/M - CAA	32	24	75.00	1.750 0	1.355 4	0.221 5	0.342 7
E - TCG/M - GTC	25	21	84.00	1.840 0	1.351 7	0.225 3	0.356 9
E - GCT/M - ACG	40	39	97.50	1.975 0	1.583 9	0.332 0	0.492 7
E - TCG/M - CTT	32	24	75.00	1.750 0	1.323 3	0.202 4	0.316 9
E - ACT/M - GAT	22	14	63.64	1.590 9	1.154 9	0.111 5	0.188 7
E - ACT/M - GTG	28	22	78.57	1.785 7	1.265 9	0.180 1	0.291 4
E - TGA/M - CTG	27	20	74.07	1.740 7	1.275 6	0.181 5	0.291 0
E - GCT/M - TAG	28	25	89.29	2.000 0	1.451 1	0.277 1	0.428 9
E - ACA/M - CGA	26	21	80.77	1.807 7	1.172 1	0.124 4	0.218 9
E - ACA/M - GAC	28	22	78.57	1.750 0	1.178 4	0.127 2	0.220 9
E - ACA/M - GTC	28	21	75.00	1.750 0	1.230 5	0.152 0	0.250 2
E - GTT/M - TTC	30	23	79.31	1.766 7	1.301 0	0.190 1	0.301 9
E - GCT/M - TGC	17	14	82.35	2.000 0	1.375 6	0.230 6	0.359 7
E - CAG/M - AGT	27	17	62.96	1.592 6	1.205 0	0.135 0	0.217 6
E - CAG/M - TGC	32	25	78.13	1.750 0	1.305 9	0.189 5	0.299 0
E - CAG/M - TAG	26	19	73.08	1.692 3	1.258 6	0.166 1	0.267 6
E - CAG/M - CAA	34	26	76.47	1.764 7	1.148 5	0.117 2	0.211 7
E - CAG/M - GAT	20	15	75.00	1.750 0	1.225 9	0.149 6	0.246 8
E - GTA/M - GAC	24	18	75.00	1.750 0	1.335 0	0.201 6	0.311 8
E - GCA/M - GAT	26	21	80.77	1.807 7	1.297 7	0.189 6	0.300 5
E - GCA/M - GTC	19	12	63.16	1.631 6	1.346 8	0.206 9	0.314 7
E - CCT/M - TGC	28	26	92.86	2.000 0	1.570 3	0.334 3	0.503 1
E - GCT/M - GAC	42	40	95.24	2.000 0	1.573 3	0.335 5	0.503 9
平均值	28.19	22.31	78.44	1.799 2	1.315 1	0.198 8	0.314 9
总和	733	580					

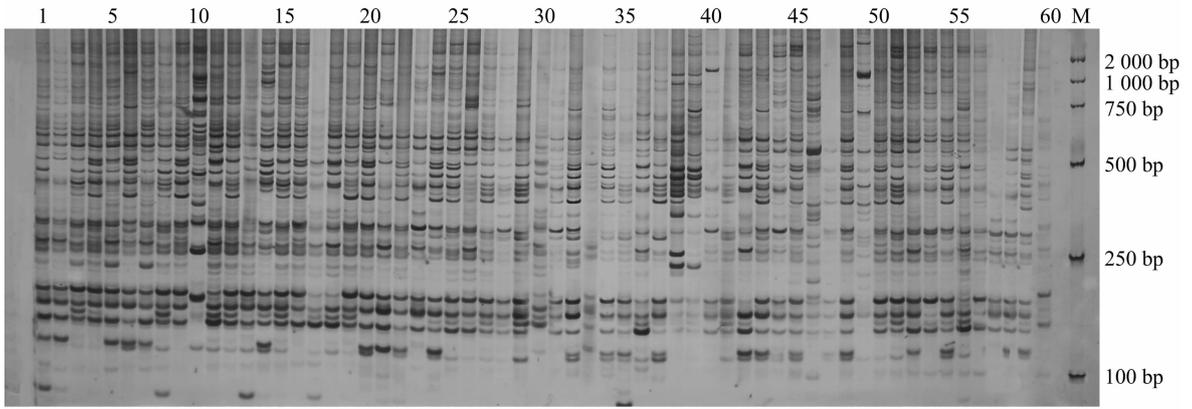


图2 引物 E-GTT/M-TTC 对 60 份山药材料的 AFLP 扩增结果

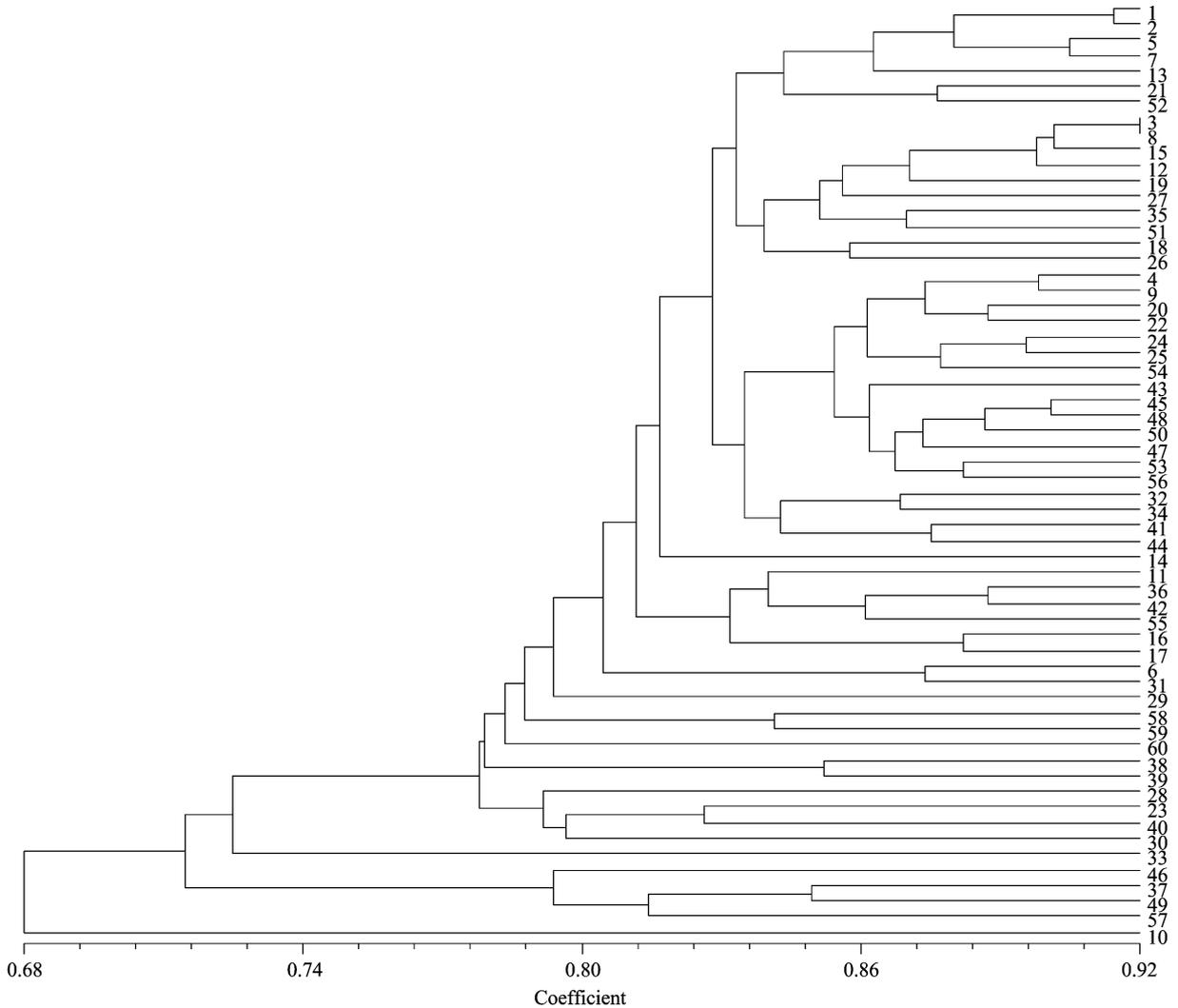


图3 60 份山药材料的 AFLP 聚类分析结果

表现出丰富的多样性和相似性,其中温县铁棒山药(3)和细毛山药(8)遗传相似系数最大,为 0.922,表明两者间遗传差异较小;广淮(10)和德泽红皮山药(57)遗传相似系数最小,为 0.619,表明两者间遗传差异较大。

在遗传相似系数为 0.68 时,60 份山药种质除广淮(10)外,其他聚为一大类群,表明广淮与其他种质间虽有共同的遗传基因,但遗传相似系数相对较小,存在较大的遗传差异。在遗传相似系数为 0.74 时,可将第一大类群分为 2 个亚类群和一个单

独分支,淮山药(33)较为特殊单独聚为一类,来源于云南地区的会泽山药(46)、云南富民山药(37)、播乐赖皮山药(49)、得泽红皮山药(57)聚为第一亚类,其他材料聚为第二大亚类。

3 讨论与结论

形态学标记是通过观察植株的表型性状来区分品种间差异,是评价种质遗传多样性最简单直观的方法,但易受外界环境和内在遗传变异的影响^[13]。本试验对 60 份山药种质 21 个表型性状进行分析,在 15 个质量性状中,除叶的缺裂均为浅裂外,其他 14 个质量性状存在不同程度差异,遗传多样性指数最高的是叶形,其次为叶色;6 个数量性状平均变异系数为 30.07%,块茎质量的变异系数最大,叶长变异系数最小。通过形态学聚类发现欧氏距离为 1.081 6 ~ 11.425 9,说明试验所选材料表型差异大,遗传多样性丰富。杨明通过对 30 份山药材料的 13 个形态指标进行分析,表明块茎长、块茎周长和叶形 3 个形态指标是彼此独立的,对山药的生长进化各有其重要意义,可以作为山药形态学分类的标准^[14]。李丽红等对福建 72 个山药地方品种资源的 19 个主要农艺性状进行遗传多样性分析,其中 12 个质量性状遗传多样性指数均介于 0.738 3 和 1.568 3 之间,平均值为 1.017 3,叶片质地较高,零余子及是否开花较低,7 个数量性状的平均变异系数为 33.17%^[15],本试验结果与之相近,说明山药群体中存在丰富的表型变异。覃维治等根据表型性状的遗传差异将 44 份淮山药种质分为 4 类,性状相近且区域内生态环境相似的材料聚为一类,各个类群都存在着相应的形态学特征,12 个质量性状中,叶形的遗传多样性指数最高^[16],本试验结果与之一致,说明在通过表型性状研究山药遗传多样性时,除块茎粗、块茎长、块茎质量这些对山药产量起决定作用的指标外,叶形特点也具有重要的研究意义。参照《中国植物志》^[17]有关山药的信息及前人的一些研究,根据本试验所收集到的数据,如叶片特点上可将本试验中所用到的材料区分为薯蕷、参薯、日本薯蕷这三大类,薯蕷的叶片小至中、绿色、叶形为戟形、心形或三角形;参薯的叶片中至大、浅绿色、叶形多为心形;日本薯蕷叶片较大、深绿色、心形或三角形。其中参薯包括广淮、曲靖山药、得泽红皮山药、播乐赖皮山药、会泽山药、云南富民山药,日本薯蕷包括日本山药-2 和日本山药-3,其

他山药材料为薯蕷。

分子标记是从 DNA 水平直接反映品种间差异,普遍认为是最有效的遗传标记方法^[18-19]。本试验用筛选出多态性较好的 26 对引物组合扩增出多态性条带 580 条,平均每对引物扩增出 22 条多态性条带,平均多态率 78.44%;Nei's 基因多样性指数、Shannon 信息指数平均值为 0.198 8 和 0.314 9,遗传相似系数在 0.619 ~ 0.922 之间,表现出材料间有丰富的多样性和相似性。在遗传相似系数为 0.74 时,可将 60 份山药种质分为 2 个类群和 2 个单独分支(广淮、淮山药),广淮在聚类树状图的根基处自成一类,根据形态特征和聚类分析应属于参薯,主要分布在广东,与其他地区相比广东地区长夏无冬,降水充沛,农作物的生育期较长,可能在长期的生长发育过程中为适应环境产生了变异,易区别于其他品种;淮山药在聚类中单独分为一类可能由于其叶片较大、块茎较小,与其他薯蕷种质差别较大造成的。Wu 等对 21 个山药地方品种进行遗传多样性分析,ISSR 和 SRAP 的多态性分别为 95.3% 和 93.5%,表明这些地方品种间存在较高的多态性^[20]。华树妹等利用 RAPD 标记方法对采集自福建各地的 34 份山药资源进行遗传多样性研究,24 对引物多态性比例达 88.5%,当遗传系数为 0.66 时,将 34 种资源划分为扁山药、普通山药、福建大薯和参薯 4 类^[21]。

本试验采用形态学标记和 AFLP 分子标记 2 种方法聚类分析了 60 份山药种质资源的遗传多样性。研究发现,山药种质资源的形态聚类方式和 AFLP 标记聚类方式存在一定差异,形态学聚类结果显示,当遗传距离为 8.18 时可将供试材料分为两大类,茎蔓截面为方形的 2 份材料河南焦作山药(2)和沈阳草河口山药(39)与其他 58 份种质分开,这两者形态有相同特点但在基因水平不是特别相近,通过分子标记可将这 2 类种质区分开,表明 DNA 分子标记更能直接、准确地将山药种质资源分类。部分山药种质在 2 种聚类图上都被聚到了一起,如日本山药-2(6)和日本山药-1(31)、河南山药-2(32)和河南铁棍-2(34)、太谷山药-2(58)和山西山药(59)相似系数都在 0.800 0 以上,表明它们之间可能是近缘关系或同一品种的不同品系经过地区间引种、人为定向选择产生了种内变异,但遗传相似度仍较高。当形态聚类遗传距离在 7.36 时可将云南薯蕷中曲靖山药(29)、播乐赖皮山药(49)、

德泽红皮山药(57)从其他资源中分出,而当分子聚类遗传系数为 0.716 时,将来源于云南地区的会泽山药(46)、云南富民山药(37)、播乐赖皮山药(49)、得泽红皮山药(57)从其他材料中分出,其主要特征为茎左旋、叶片浅绿色心形、不着生零余子、薯块表皮和肉色均为白色,说明这些云南薯蕷无论从形态还是分子水平都与其他材料有着明显差异,但单独用一种标记方法很难将它们相互之间准确分开,而使用形态和分子结合的方法则可以将它们更好地区分开。该分类也与刘向宇利用表型性状和 ISSR 分子标记方法对山药种质资源分析所得到的结果^[22]相似。黄姗通过 SRAP 标记聚类分析将 94 份山药资源分为 5 类,其中前 4 类分别为薯蕷、褐苞薯蕷、山薯和参薯,与形态特征分类一致,而第 5 类的 3 份资源按形态分类属于参薯类,在分子标记聚类分析中则自成一类,与其他参薯相比较存在特殊形态特征,表明分子标记研究种质资源较高准确性^[23]。通过聚类分析发现,本试验所选材料普遍为北方地区种植的薯蕷,缺少广东、广西主栽品种山薯和广西、福建等地区的褐苞薯蕷,并不能代表我国所有山药种质的遗传背景,今后应多收集全国不同地区不同品种的山药材料加以分析研究。形态学研究 and 分子研究结果存在差异在于它们在不同层面上表现植物的遗传多样性,形态学研究根据植物的表型性状来区分遗传变异和品系差异,而分子标记直接体现了种质之间的基因型差异,与基因表达和环境条件无关,因此其亲缘关系分析结果更准确^[24]。山药具有很强的区域性,不同生态区域对同一种质的生长发育和形态特征有较大影响。因此,在遗传多样性研究中,选择形态学标记与分子标记相结合,有助于更客观、更准确地确定种质资源间的特异性。

参考文献:

- [1]张静珍,王连军,雷 剑,等. 基于 cpSSR 标记的山药种质资源 DNA 指纹图谱构建及遗传多样性分析[J]. 浙江农业学报, 2021,33(7):1222-1233.
- [2]郭林宇,汤晓艳. 国内山药营养品质、影响因素及评价方法研究进展[J]. 中国食物与营养,2021,27(12):53-60.
- [3]陈 阳,周先治,林永胜,等. 不同山药种质主要性状比较与遗传多样性分析[J]. 福建农业学报,2016,31(9):945-949.
- [4]郭 文,李婉琳,肖继坪,等. 利用 AFLP 标记构建 4 种薯蕷属植物的指纹图谱[J]. 分子植物育种,2015,13(3):547-555.
- [5]许 云,吴文婧,谢 俊,等. 111 份大薯种质资源遗传多样性 AFLP 分析[J]. 植物遗传资源学报,2014,15(2):299-304.
- [6]Mengesha W A, Demissew S, Fay M F, et al. Genetic diversity and species delimitation in the cultivated and wild Guinea yams (*Dioscorea* spp.) from Southwest Ethiopia as determined by AFLP (amplified fragment length polymorphism) markers [J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2013, 60(4):1365-1375.
- [7]王 丹,于肖夏,于 卓,等. 马铃薯杂种优良株系遗传差异的 AFLP 分析[J]. 草业学报,2016,25(9):117-124.
- [8]许念芳,岳林旭,刘少军,等. 山药种质资源的分类及综合分析[J]. 中国野生植物资源,2019,38(1):54-59.
- [9]张佳佳,霍秀文,王志敏,等. 薯蕷属 28 种山药 psbA-trnH 序列系统学分析[J]. 分子植物育种,2017,15(6):2412-2419.
- [10]孙瑞芬,张艳芳,郭树春,等. 向日葵盐胁迫相关基因的 cDNA-AFLP 差异表达[J]. 中国生物工程杂志,2015,35(1):34-40.
- [11]王志敏,霍秀文,张艳芳,等. 山药 (*Dioscorea opposita*) 块茎不同发育时期相关差异基因的 cDNA-AFLP 分析[J]. 分子植物育种,2019,17(11):3650-3659.
- [12]吴金平,矫振彪,郭凤领,等. 基于形态学标记的山药种质资源遗传多样性研究[J]. 中国野生植物资源,2017,36(1):11-14,29.
- [13]Padhan B, Mukherjee A K, Mohanty S K, et al. Genetic variability and inter species relationship between wild and cultivated yams (*Dioscorea* spp.) from Koraput, India based on molecular and morphological markers [J]. Physiology and Molecular Biology of Plants, 2019, 25(5):1225-1233.
- [14]杨 明. 山药种质资源遗传多样性的研究[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学,2012.
- [15]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),2016,31(2):257-262.
- [16]覃维治,韦本辉,甘秀芹,等. 淮山药种质资源主要农艺性状遗传多样性分析[J]. 南方农业学报,2014,45(10):1726-1733.
- [17]裴 鉴. 中国植物志:第 16 卷第 1 分册[M]. 北京:科学出版社,1985:54-120.
- [18]Yin Y, An W, Zhao J H, et al. Constructing the wolfberry (*Lycium* spp.) genetic linkage map using AFLP and SSR markers [J]. Journal of Integrative Agriculture, 2022, 21(1):131-138.
- [19]卢 霞,刘梦华,邓志军,等. 基于 InDel 标记的黄瓜种质资源遗传多样性分析[J]. 江苏农业科学,2021,49(1):49-54.
- [20]Wu Z G, Li X X, Lin X C, et al. Genetic diversity analysis of yams (*Dioscorea* spp.) cultivated in China using ISSR and SRAP markers[J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2014, 61(3):639-650.
- [21]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.
- [22]刘向宇. 山药种质资源遗传多样性分析及核心种质的构建[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学,2015:14-32.
- [23]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,2011:27-31,37.
- [24]邓禄军,吴巧玉,何天久,等. 基于形态学和 ISSR 分子标记的迷你甘薯遗传多样性分析[J]. 种子,2021,40(10):56-61.