

山藥種原外表形態及分子標記之變異研究¹

賴瑞聲^{2,3} 高瑞隆² 林義恭² 胡敏夫² 劉新裕²

摘要

賴瑞聲、高瑞隆、林義恭、胡敏夫、劉新裕。2005。山藥種原外表形態及分子標記之變異研究。台灣農業研究 54:195-206。

三十二個山藥參試品種(系)屬於 8 個物種及 1 個變種，包括 *Dioscorea alata* L.(17 個)、*D. alata* L. var. *purpurea*(3 個)、*D. batatas*(5 個)、*D. pseudojaponica*(2 個)、*D. doryphora*(1 個)、*D. esculenta*(1 個)、*D. bulbifera*(1 個)及 *D. rotundata*(1 個)及 *D. persimilis*(1 個)進行外表形態調查及 RAPD 分子性狀分析，以探討物種間及物種內之變異。取其葉片 DNA 進行 RAPD 分析，在 40 個隨機引子對中，有 12 個引子對可穩定擴增出 43 個多型性片段，進一步進行群組分析時可明確分成七群，與物種歸屬符合，其中以 *D. alata* 為最大群，種內可分為五小群，分別為塊狀薯群、罐形薯群、紅皮白肉山藥群、紅肉山藥群、長薯山藥群，而優良品系大汕二號與台農 2 號明顯不同。儘管同一群內品種(系)分子鑑定仍有困難，但外表形態分群結果與 RAPD 分析分群相呼應，表示可依種群進行特色開發，進行群內品系選育，以達到多樣化育種目的，可讓消費者有更明確的選擇。

關鍵詞：山藥、外表形態、分子標記。

前言

山藥(*Dioscorea spp.*)在全世界超過 600 個種，其地下塊莖(擔根體)可作為食用及藥用，主要的食用山藥是 *D. alata* 及 *D. rotundata* 二個種，在 *D. alata* 種中有最大變異，染色體倍數有 $2N=20$ ，40，60 或 80，形態也有不同，開花結實特性也有差異，高度多倍體多為不稔(Abraham & Nair 1991; Abraham 1998); 受到矚目的藥用成分是薯蓣皂苷(diosgenin)，可作為脫氫異甾固酮(dehydroepiandrosterone, DHA)生產原料，其含量高低在物種間有極大差異，生藥工業最常利用的是 *D. composita* 及 *D. floribunda* 二個物種(Martin 1969)。台灣地區有 14 個山藥物種及 4 個變種(Huang & Hsia 2000)，目前之栽培品種系主要源自 5 個物種：*D. alata*，*D. batatas*，*D. bulbifera*，*D. doryphora*，及 *D. pseudojaponica*，有台灣原生品系，或由大陸、日本地區引進者，現有品種(系)超過 100 個，各有不同特性，產量、品質差異甚大(劉等 1999)。Salda 等學者(1998)以 *D. alata*，*D. esculenta*，*D. hispida*，*D. pentaphylla* 及 *D. rotundata* 五個種之 15 個品系山藥粉為材料，針對與食品加工有關之澱粉特性(直鏈澱粉含量、膨脹體積、糊化溫度、麵糊黏性及膠體質地)進行評估，結果顯示種間及種內有明顯差異，野生及栽培種的 *D. pentaphylla* 與

1. 行政院農委會農業試驗所研究報告第 2238 號。接受日期：94 年 9 月 9 日。

2. 本所農藝組助理研究員、助理研究員、助理研究員、副研究員、研究員。臺灣 臺中縣 霧峰鄉。

3. 通訊作者，電子郵件：larry@wufeng.tari.gov.tw；傳真機：(04)23302806。

D. alata 澱粉特性變域大，具有麵條製作及高黏性加工需求的開發潛力；喀麥隆(Cameroon)地區 8 個山藥物種(98 個品種)在乾物重、澱粉、脂質及蛋白質等含量在種間有差異，尤其蛋白質含量歧異度最大，種內不同品種也可據以區別(Agboregbe & Treche 1995)。藥用山藥(*D. floribunda*)雌性株品系之塊莖產量及薯蕷皂苷含量分別比雄性株品系高出 60% 及 83%(Singh *et al.* 1995)。

近年來山藥受到台灣地區消費大眾的喜愛，種植面積增加，但品種(系)多以山藥或淮山為名流通，造成市場的紊亂，如何確認品種(系)之外表形態及親緣性，不但是山藥種原收集之必備資料，也是進行多樣化品種選育的參考資料。本所目前依形態將收集的品種(系)分為三大類：方莖白肉類、圓莖白肉類及紅肉類(劉等 2000)，但品種(系)間之區分尚未建立。外表形態調查一直是品種鑑別的主要參考，但易受到環境的影響而不穩定，配合蛋白質及 DNA 分子標誌進行品種鑑別及親緣性探討，會使得變異研究更為準確。本試驗以 32 個山藥品種(系)為材料，藉由外表性狀調查及 RAPD 分子標記分析，期望能對山藥進行更精確的分類，可作為多樣化品種選育之重要參考。

材料與方法

參試品種系

本試驗所用材料為方莖白肉類、圓莖白肉類及紅肉類山藥共 32 個山藥品種(系)，分別屬於 8 個物種及 1 個變種，品種(系)名稱及類別詳如表 1。32 個山藥品種(系)於 2001 年 4 月間種植於台中霧峰本所試驗田，行株距為 150cm×30cm，四重複，每一重複種植 20 株，採穴植管引導栽培方式。

外表性狀及生育特性調查

依山藥生長時序進行外表形態調查：(1)幼苗第一葉展開時間：莖蔓大於或小於 30cm 時。(2)塊莖形成時間：萌芽隨即形成或萌芽二個月之後。(3)莖形態：形狀、左右旋性(順逆時針)、莖徑、翼及刺的有無。(4)葉片形態：包括葉片形狀、質地、葉序、葉柄顏色。(5)零餘子含量：有無及重量。(6)開花特性：開花有無，雌花或雄花。

隨機擴增核酸序列多型性(RAPD)分子標記分析

DNA 萃取：以 CTAB-PVP 法抽取 32 個山藥品種(系)之幼嫩葉片 DNA。秤取山藥幼葉 0.1g，於研鉢中加入液態氮磨成粉狀，未潮解時加入 600 μ l 2%CTAB 萃取緩衝液(2%CTAB; 1.4M NaCl; 100mM Tris-HCl, PH8.0; 20mM EDTA; 0.2% β -mecaptoethanol)，充分拌勻後裝入 1.5ml 小離心管，於 65 $^{\circ}$ C 水浴中加熱 30 分鐘，加熱期間須不時混合。以 14000rpm 離心 10 分鐘，將上清液倒至另一小離心管，每管加入 600 μ l chloroform/ isoamylalcohol(24:1, v/v)劇烈震盪使呈乳液狀態，再以 14000rpm 離心 10 分鐘使二液相分離，取上清液至新離心管，加入 40 μ l 10%CTAB(含 0.7M NaCl)及 400 μ l chloroform/ isoamylalcohol 混合，再以 14000rpm 離心 10 分鐘使二液相分離。取約 400 μ l 上清液至另一離心管，每管加入 400 μ l CTAB 沈澱緩衝液(1%CTAB; 50mM Tris-HCl, PH8.0; 10mM EDTA)，置於冰上 15-20 分鐘，而後以 14000rpm 離心 10 分鐘，倒除上清液，沈澱物即為 DNA。加入 400 μ l high-salt TE(10mM Tris-HCl, PH8.0; 1mM EDTA; 1M NaCl)清洗 DNA，再加入 800 μ l 95%ethanol，以 14000rpm 離心 15 分鐘。倒除上清液，加入 400 μ l 75%ethanol 靜置 10 分鐘以清洗鹽類，而後倒除清洗液，倒蓋 10 分鐘使 DNA 乾燥。加入 100 μ l 無菌蒸餾水以溶解 DNA。取 10 μ l DNA 原液加入 990 μ l 蒸餾水(即稀釋 100 倍)，利用分光光度計測定 OD₂₆₀ 及 OD₂₈₀ 吸光值。

原液 DNA 濃度(ng / μ l)=OD₂₆₀ 讀值×100(稀釋倍數)×50(係數)

RAPD 分析：以 Operon 公司(Operon Technologies, Alameda, Calif)的 10-mer 隨機引子 OPA 及 OPB

二組共 40 個隨機引子進行 PCR 擴增。反應利用 Perkin Elmer 公司之 Gene Amp™ PCR System9700 進行反應。反應總體積為 10 μ l，內含 50mM MgCl₂，200 μ M dNTP(dATP, dTTP, dCTP, dGTP)，0.5 μ M 的隨機引子，約 10ng 植體 DNA 及 5U/ μ l *Taq* DNA polymerase，總體積以無菌蒸餾水補足 10 μ l。PCR 反應條件為 94 $^{\circ}$ C 2 分鐘，再以 94 $^{\circ}$ C 60 秒，36 $^{\circ}$ C 30 秒，72 $^{\circ}$ C 90 秒，循環 2 次；94 $^{\circ}$ C 20 秒，36 $^{\circ}$ C 20 秒，72 $^{\circ}$ C 90 秒，循環 40 次，所得擴增產物進行電泳分析。

電泳分析：PCR 擴增產物於 2% Agarose 膠片進行電泳分析(100V 電壓，40 分鐘)，再於 0.5 μ g/ ml EtBr 染色及蒸餾水退染各 15 分鐘，記錄有多型性之條帶。

統計分析：多型性條帶之有、無以 1、0 記錄，依 Jaccard (1908)定義計算遺傳相似度，再以 UPGMA Cluster procedure 進行群組分析，探討品系間之親緣性。所用統計分析軟體為 NTSYS(Version 2.01b, Applied Biostatistic Inc.)。

表 1. 32 個山藥參試品種（系）類別及名稱

Table 1. The clusters and names of 32 yam varieties (lines) in this experiment

Cluster	Variety (line)	Chinese name	Species
Cluster of quadrangular stem and white flesh tuber (方莖白肉類)	Tainung 1	台農 1 號	<i>Dioscorea alata</i> L.
	Chun rih	春日品系	<i>D. alata</i> .
	TUBA		<i>D. alata</i>
	Tainung 2	台農 2 號	<i>D. alata</i>
	Da shan line 2	大汕二號	<i>D. alata</i>
	Tai ya	泰雅品系	<i>D. alata</i>
	Line 11	品十一	<i>D. alata</i>
	Da shan line 3	大汕三號	<i>D. alata</i>
	San zhi A	三芝 A	<i>D. alata</i>
	Zhong guo chang	中國長	<i>D. alata</i>
	Bei tou	北投品系	<i>D. alata</i>
	Hong pi chang	紅皮長品系	<i>D. alata</i>
	Er cih	二刺品系	<i>D. alata</i>
	Da ye shou feng	大葉壽豐	<i>D. alata</i>
	Yang ming shan	陽明山	<i>D. alata</i>
Cluster of red flesh tuber (紅肉類)	F155		<i>D. alata</i>
	ALA014	新加坡品系	<i>D. alata</i>
	Ming jian chang hong	名間長紅	<i>D. alata</i> L. var. <i>purpurea</i>
	Zih yu xie shu	紫玉血薯	<i>D. alata</i> L. var. <i>purpurea</i>
Cluster of round stem and white flesh tuber (圓莖白肉類)	Pu li line 1	埔里一號	<i>D. alata</i> L. var. <i>purpurea</i>
	Xiao ye shou feng	小葉壽豐	<i>D. batatas</i> Decne
	Da huai	大淮品系	<i>D. batatas</i>
	D89A1		<i>D. batatas</i>
	D89B1		<i>D. batatas</i>
	Cing sen	青森品系	<i>D. batatas</i>
	Ji long	基隆品系	<i>D. pseudojaponica</i> Yamam
	Ba gua shan yuan sheng	八卦山原生	<i>D. pseudojaponica</i>
	Heng chun	恆春品系	<i>D. doryphora</i> Hance
	Jia yi mi shu	嘉義蜜薯	<i>D. esculenta</i>
	Huang yao shu	黃藥薯	<i>D. bulbifera</i>
Zhong liao	中寮品系	<i>D. persimilis</i>	

結 果

地上部外表性狀調查

三十二個山藥參試品種(系)於 2001 年 4 月初種於田間，依時序調查幼苗形態、生長勢及成熟植株莖、葉片形態，以及生育後期之開花與否等地上部外表形態，重要性狀調查結果列如表 2。其中 *D. alata* 莖為方形或多稜形，是與其他種區分的重要依據，台農 1 號莖的翼為綠色且小於 1mm，而二刺品系

表 2. 山藥品種(系)地上部外表形態調查
Table 2. Plant morphological trait investigation of yam

Species	Variety (line)	First leaf expanding ^z	Tuber initiation ^y	Stem characteristic ^x	Leaf characteristic ^w	Aerial bulbils	Flowering
<i>D. alata</i>	Tainung 1	E	L	Gq, GW<1mm, tAC, SD0.5~0.8cm	GCco, LI ≥ 12cm, AbOa, GP	No	No
	Chun rih	E	L	Gq, PW<1m, tAC, SD0.5~0.8cm	GCch, LI ≥ 12cm, AbOa, GPpbe	No	No
	TUBA	E	L	Gq, PW<1mm, tAC, SD0.5~0.8cm	GCch, LI ≥ 12cm, AbOa, GPpbe	No	No
	Da shan line 2	E	L	Gq, Gwpe<1mm, tAC, SD0.5~0.8cm	GSco, LI ≥ 12cm, AbOa, GP	No	No
	Tai ya	E	L	Gme at base without spine and wing, Gq at above, GW<1mm tAC, SD0.5~0.8cm	GCco, LI ≥ 12cm, AbOa, GP	No	No
	Tainung 2; Da ye shou feng; Da shan line 3; Line 11; San zhi A	E	L	Gq, Gwpe<1mm, tAC, SD0.5~0.8cm	GCch, LI ≥ 12cm, AbOa, GP	No	No
	Zhong guo chang; Bei tou; Hong pi chang	E	L	Gq, Pw<1mm, tAC, SD0.5~0.8cm	GSch, LI ≥ 12cm, AbOa, GPpbe	No	No
	Er cih	E	L	Gq, GW ≥ 2mm, tAC, SD0.5~0.8cm,	GSch, LI ≥ 12cm, AbOa, GP	No	No
	ALA014	E	L	Gq, GW<1mm, tAC, SD 0.5~0.8cm	GSch, LI ≥ 12cm, AbOa, GP	No	No
	Yang ming shan; F155	E	L	Gme, Spb, tAC, SD 0.5~0.8cm	GCco, LI ≥ 12cm, AbOa, GP	No	No
<i>D. alata</i> L. var. <i>purpurea</i>	Ming jian chang hong; Zih yu xie shu; Pu li line 1	E	L	Gq, PW<1mm, tAC, SD 0.5~0.8cm	GSch, LI ≥ 12cm, AbOa, GPpbe	No	No

^z First leaf expanding: E=early, stem length ≤ 30cm; L=late, Stem length > 30cm.

^y Tuber initiation: E=early, as soon as shoot emergence; L=late, more than two months after shoot emergence.

^x Stem characteristic: Gq= Green quadrangular stem; Gr= Green round stem; PGr= Purple green round stem; Gme= Green multi-edged stem; Gmeb= Green multi-edged stem at base; Br= Brownish round stem; tAC= twining anticlockwise; tC= twining clockwise; SD= stem diameter; GW= green wing; GWpe= green wing with purple edge; PW= purple wing.; SPa= spine on above stem; SPb=spine on base stem; SPab= spine on above and base stem; FH=fine hair on the stem.

^w Leaf characteristic: GCco= Green cordate coriaceous leaf; GCch= Green cordate chartaceous leaf; GSco= Green sagittate coriaceous leaf; GSch= Green sagittate chartaceous leaf; GSLco=Green sagittate long coriaceous leaf; GOLco= Green ovate long coriaceous leaf; GHch= Green hastate chartaceous leaf, LI=leaf length; AbOa = leaf position alternate at base and opposite above; GP= green petiole; GPpbe= green petiole with purple at both end.

表 2. 山藥品種(系)地上部外表形態調查(續)

Table 2. Plant morphological trait investigation of yam (continued)

Species	Variety (line)	First leaf expanding ^z	Tuber initiation ^y	Stem characteristic ^x	Leaf characteristic ^w	Aerial bulbils	Flowering
<i>D. pseudojaponica</i>	Ji long	L	E	Gr, tAC, SD \leq 0.4cm	GSLco, LI \leq 10cm, AbOa, GP	Yes, <2g	Yes
	Ba gua shan yuan sheng	L	E	Gr, tAC, SD \leq 0.4cm	GOLco, LI \leq 10cm, AbOa, GP	Yes, <2g	Yes
<i>D. batatas</i>	Xiao ye shou feng; Cing sen; Da huai	L	E	PGr, tAC, SD \leq 0.4cm	GCch with lobe in the middle, LI \leq 10cm, AbOa, GPpbe	Yes, <2g	No
	D89B1	L	E	Gr, tAC, SD \leq 0.4cm	GCch with lobe in the middle, LI \leq 10cm, AbOa, GPpbe	Yes, <2g	No
	D89A1	L	E	Gr, tAC, SD \leq 0.4cm	GCch with distinct lobe in the middle, LI \leq 10cm, AbOa, GPpbe	Yes, <2g	No
<i>D. doryphora</i>	Heng chun	L	E	Gr, tAC, SD \leq 0.4cm	GHch, LI \leq 10cm, AbOa, GP	Yes, <2g	Yes
<i>D. rotundata</i>	Africa yam	E	L	Gr, SPb, tAC, SD \leq 0.4cm	GCch, LI \geq 12cm, AbOa, GP	No	No
<i>D. persimilis</i>	Zhong liao	L	L	PGr, SPb, tAC, SD \leq 0.4cm	GCco, LI \geq 12cm, AbOa, GPpbe	Yes, >3g	Yes
<i>D. bulbifera</i>	Huang yao shu	L	L	Gr, tC, SD \leq 0.4cm	GCch, LI \geq 12cm, AbOa, GP	Yes, >4g	No
<i>D. esculenta</i>	Jia yi mi shu	E	L	Br, SPab, FH, tC, SD \leq 0.4cm	GCch, LI \geq 12cm, fine hair of upper surface of yang leaf, AbOa, GP	No	Yes

翼大於 2mm，可區分這二個品種(系)。紅肉山藥(如名間長紅)及紅皮白肉山藥(如 TUBA，中國長)幼苗為紫紅色，與 *D. alata* 其他品種(系)明顯不同，並且翼為紫色，葉柄二端為紫色，是與白皮 *D. alata* 山藥區分的主要依據，然而，紅皮紅肉與紅皮白肉僅有紫色深淺之差別，以地上部來區分並不容易，此外，埔里一號與 TUBA 品系葉片明顯較大(葉片長大於 17cm)，與名間長紅及中國長等(葉片長 12~15cm)略有不同。泰雅品系心形革質葉片，莖基部為多稜形無翼，先端為方形有翼是其特徵。台農 2 號、品十一及三芝 A 等品種(系)在地上部外表形態極為相似，皆為方莖有綠色紫邊翼，心形紙質葉片，葉色為淡綠色。大汕二號為箭鏃形革質葉，葉色較濃綠，明顯與台農 2 號等不同。陽明山及 F155 品系外表形態相近，葉片革質濃綠，多稜形莖且基部有刺，可與其他 *D. alata* 品種(系)區分。

D. batatas、*D. doryphora* 及 *D. pseudojaponica* 山藥概稱為小葉圓莖山藥，葉片長度通常小於 10cm，莖圓形且莖徑小於 0.4 mm，通常有珠芽(零餘子)，常可見到植株開花。基隆品系及八卦山原生山藥同為 *D. pseudojaponica* 物種，葉片為革質細長型(寬度 \leq 2 cm)，基隆品系葉片基部似三角形，八卦山原生為卵圓形。*D. batatas*(與 *D. opposita* 相同)物種之大陸淮山、小葉壽豐等品系莖為紫綠色，葉片為紙質，中間略有刻裂。恆春品系(*D. doryphora*)又稱戟葉山藥，戟形葉片是其主要特徵。非洲山藥

(*D. rotundata*)為綠色圓莖、紙質葉片，葉片長度一般大於 12cm。嘉義蜜薯(*D. esculenta*)及黃藥薯(*D. bulbifera*)莖蔓為順時針旋性，與其他物種不同，是其重要特徵；嘉義蜜薯莖為褐綠色，莖上有刺及絨毛，幼葉有絨毛，而黃藥薯莖無刺無絨毛，零餘子大，多為圓形(一般直徑大於 2cm)是主要特徵。中寮品系(*D. persimilis*)為紫綠色圓莖，葉片長心形革質，葉片長度一般大於 12cm，零餘子大，多為長橢圓形，會開花，本所收集系為雌性株品系。

依外表性狀調查，整理八個山藥物種檢索表如表 3，而品種(系)最多且變異最大之 *D. alata* 之種內分群檢索表整理如表 4。八個山藥物種地上部圖片如圖 1，而 *D. alata* 物種內五個主要種群外表形態如圖 2。

RAPD 分子標記分析

利用本研究室既有之 40 個逢機引子進行 RAPD 分析，其中有 12 個逢機引子可穩定擴增 43 個多型性片段，例如圖 3 中逢機引子 OPA-10 可穩定擴增二個多型性條帶，分子量分別約為 800 及 400bp。進一步以多型性片段之有無進行遺傳相似度及群組分析結果如圖 4，可初步分為七群，尚與植物分類

表 3. 八個山藥物種外表性狀檢索表

Table 3. Key to eight yam species via plant morphological trait

1. Stem twining anticlockwise.	
2. Quadrangular or multi-edged stem, stem with wing or with spines at base; aerial bulbil absent; cordate or sagittate leaf, length ≥ 12 cm, petiole with wing -----	<i>D. alata</i> and <i>D. alata</i> var. <i>purpurea</i>
2. Round stem with spine at base; cordate leaf, length ≥ 12 cm, petiole without wing.	
3. Green or brownish green stem; aerial bulbil absent; coriaceous leaf-----	<i>D. rotundata</i>
3. Purple green stem; aerial bulbil present, average weight > 3g; coriaceous leaf-----	<i>D. persimilis</i>
2. Round stem without wing and spine; length < 10cm, petiole without wing.	
4. Cordate leaf with lobe in the middle, green petiole with purple at both end -----	<i>D. batatas</i>
4. Hastate leaf, green petiole -----	<i>D. doryphora</i>
4. Sagittate long or ovate long leaf without lobe in the middle, green petiole -----	<i>D. pseudojaponica</i>
1. Stem twining clockwise.	
5. Green round stem without spine; globular aerial bulbil, average weight > 4g; cordate leaf -----	<i>D. bulbifera</i>
5. Green round stem with spine; aerial bulbil absent; cordate leaf, fine hair of upper surface of yang leaf -----	<i>D. esculenta</i>

表 4. 山藥 *Dioscorea alata* 物種內外表性狀分群檢索表

Table 4. Key to different clusters within *Dioscorea. alata* species via plant morphological trait

1. Purple or purple green shoot; quadrangular stem without spine but with purple; green petiole with purple at both end.	
2. Purple yang shoot and yang leaf; distinct purple leaf vein-----	Cluster of red flesh tuber (ex. Ming jian chang hong)
2. Purple green yang shoot and yang leaf; indistinct purple leaf vein -----	Cluster of white flesh tuber with red inner skin (ex. Zhong guo chang)
1. Green or brownish green yang shoot and yang leaf; quadrangular stem with wing but not spine.	
3. Green wing with purple edge < 1mm; cordate chartaceous leaf-----	Cluster of bottle-shape tuber (ex. Tainung 2)
3. Green wing < 1mm; cordate coriaceous leaf.-----	Tainung 1
3. Green wing > 2mm; sagittate chartaceous leaf.-----	Er cih
1. Multi-edged stem without wing but with spines at base; green coriaceous leaf-----	Cluster of long length tuber (ex. Yang ming shan)
1. Multi-edged stem at base without spine and wing, green above quadrangular stem with green wing < 1mm-----	Tai ya

Characteristics of *D. alata*: Stem twining anticlockwise; quadrangular or multi-edged stem, stem with wing or with spines at base; aerial bulbil absent; cordate or sagittate leaf, length ≥ 12 cm, petiole with wing.



圖 1. 八個山藥物種地上上部外表形態。(A: *Dioscorea alata* L.; B: *D. rotundata*; C: *D. persimilis*; D: *D. batatas* Decne; E: *D. pseudojaponica* Yamam; F: *D. doryphora* Hance; H: *D. esculenta*; G: *D. bulbifera*).

Fig. 1. Plant shoot morphological of eight yam species. (A: *Dioscorea alata* L.; B: *D. rotundata*; C: *D. persimilis*; D: *D. batatas* Decne; E: *D. pseudojaponica* Yamam; F: *D. doryphora* Hance; H: *D. esculenta*; G: *D. bulbifera*).

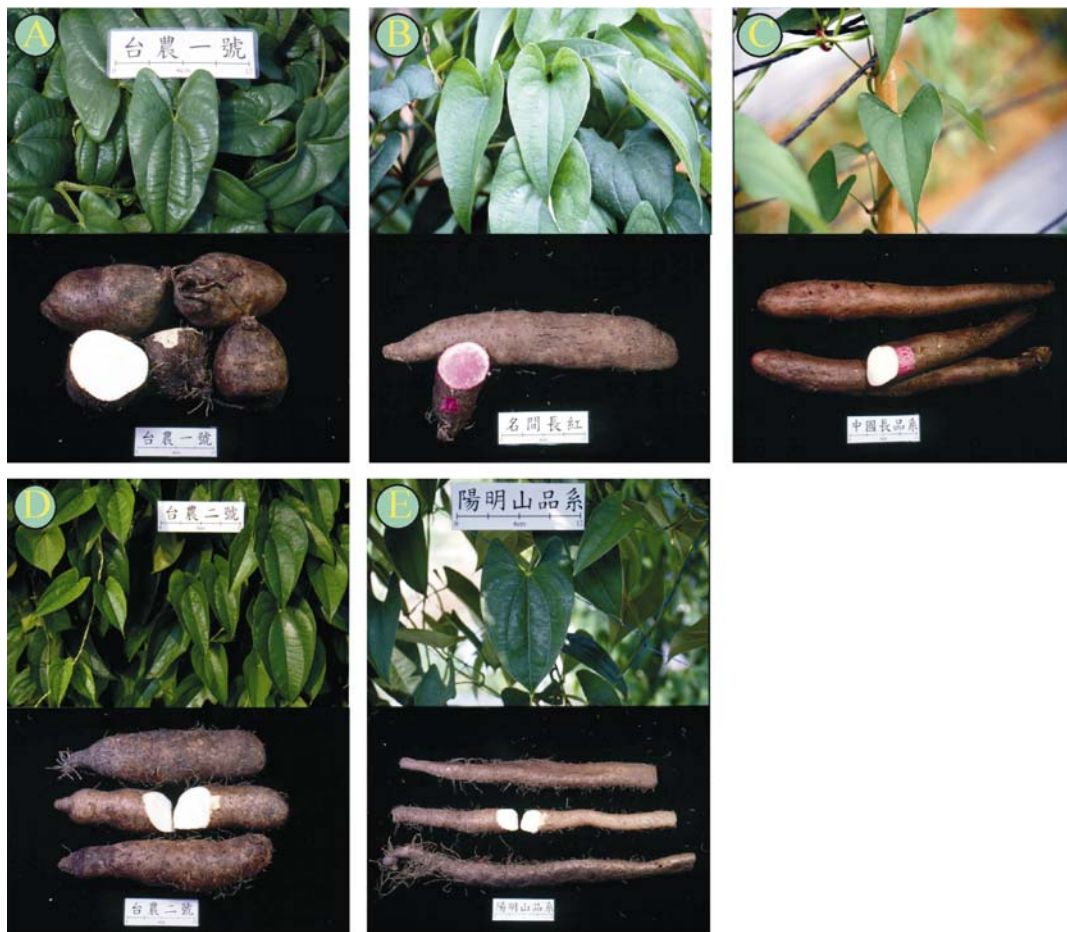


圖 2. 山藥 *Dioscorea alata* 物種內五個主要品種群外表形態。(A: 塊狀薯群，例如台農 1 號；B: 紅肉山藥群，例如名間長紅；C: 紅皮白肉山藥群，例如中國長品系；D: 罐形薯群，例如台農 2 號；E: 長薯山藥，例如陽明山品系)。

Fig. 2. Plant shoot morphological of five clusters within *Dioscorea alata* species. (A: Cluster of clumpy yam, ex. Tainung 1; B: Cluster of red flesh tuber, ex. Ming jian chang hong; C: Cluster of white flesh tuber with red inner skin, ex. Zhong guo chang; D: Cluster of bottle-shape tuber, ex. Tainung 2; E: Cluster of long length tuber, ex. Yang ming shan).

之物種相符合，最大一群為 *D. alata* 物種，共有 21 個參試品種(系)，可再進一步分為五小群，其中第一小群為台農一號、春日品系及 TUBA 品系等塊狀或短型山藥，第二小群為紅皮紅肉山藥(*D. alata* var. *purpurea*)，但同為紅肉山藥之埔里一號則與分至第一小群，第三小群為紅皮白肉(中國長等品系)，第四小群為長薯山藥(陽明山及 F155 品系，俗稱刺薯)，第五小群為台農 2 號、品十一及三芝 A 等品系，而優良品系大汕二號與台農 2 號明顯不同，如此的 RAPD 結果能與外表性狀調查結果相符合，但進一步的群內品種鑑定則仍有困難。然而，中寮品系(*D. persimilis*)出乎預期混雜在 *D. alata* 之中。

另外六群則分別是 *D. esculenta*，*D. pseudojaponica*，*D. batatas*，*D. doryphora*，*D. rotundata* 及 *D. bulbifera*，其中 *D. pseudojaponica* 與 *D. batatas* 親緣較近，而 *D. esculenta* 及 *D. bulbifera* 則明顯獨立分出。

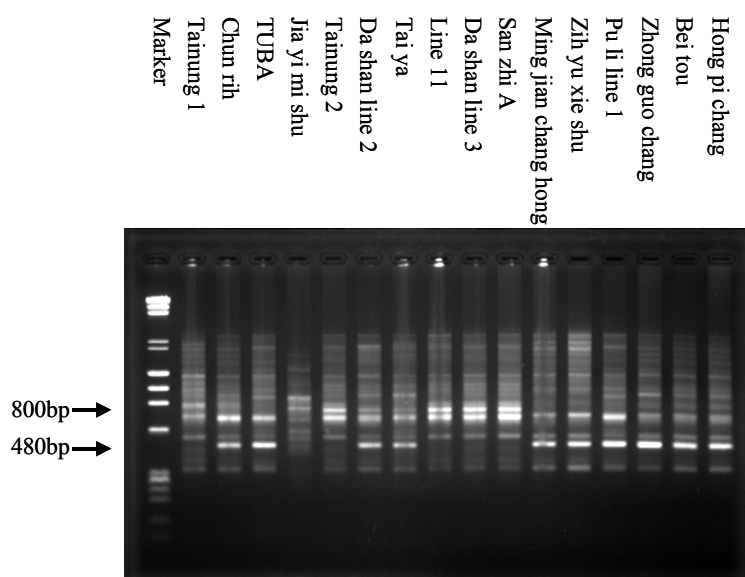


圖 3. 利用隨機引子 OPA-10 進行 RAPD 之 16 個山藥品種（系）之電泳圖譜。

Fig. 3. RAPD patterns of 16 yam varieties (lines) obtained with random primer OPA-10.

討 論

外表形態調查是植物分類主要依據，也可做為作物品種分類、分群的參考。蔡等學者(1999)對大陸地區收集之 46 個山藥品種依農藝性狀進行分類，將山藥分為 2 個物種，5 個變種，10 個品種群；2 個物種為普通山藥(*D. batatas* Decne.)與田薯(*D. alata* L.)；普通山藥分為長山藥及棒山藥 2 個變種，長山藥變種分為淺裂三角葉、深裂三角葉及長心形葉 3 個品種群；棒山藥變種為 1 個品種群；田薯分為長柱形、圓筒形及扁塊形 3 個變種；長柱形變種分為白肉品種群與淡黃肉品種群；圓筒形及扁塊形變種又各分為白肉品種群和紫紅肉品種群。本試驗中 *D. batatas* 物種之大淮品系、D89A1 及 D89B1 係由大陸地區引進，對照蔡等學者(1999)之研究，大淮品系、青森品系、小葉壽豐品系及 D89A1 屬於長山藥變種之淺裂三角葉品種群，而 D89B1 可歸於深裂三角葉品種群，主要分類依據為葉片刻裂程度，而台灣目前似乎未見長心形葉之 *D. batatas* 品系及棒山藥變種；本試驗之 *D. alata* 分群方式與蔡等學者(1999)之研究不同，台灣目前似乎沒有紫紅色葉脈之淡黃肉品種群，(紫)紅肉山藥為 *D. alata* 之一個變種 *D. alata* var. *purpurea*，此外，以薯塊長度作為分類依據並不適當，如本所栽培之大汕二號薯塊長約 80cm，而南投名間地區栽培可達 200cm 以上，也說明了農藝性狀易受到環境影響而不穩定。Bindroo 及 Bhat(1986)針對山藥 *D. deltoidea* 外表形態進行參數的穩定性分析，結果顯示塊莖內 diosgenin 含量，莖徑，及葉片寬度為穩定的性狀表現，而塊莖的長度、分叉及葉柄長度穩定性低，易受環境影響，因此表 2 所列性狀調查結果著重於質的性狀，具有穩定、可明確區分性，依據地上部外表形態可明確區分出不同的山藥物種，甚至是 *D. alata* 物種內不同類型的品系山藥，但同一類型內(如中國長，北投及紅皮長品系)則不易區分，需要其他方式輔助。

Lebot 等(1998)針對 *D. alata* 269 個品種系進行同功酶、外表形態及理化特性進行分析及分群，但三種分群結果並不一致。Sato(1997)以日本及韓國地區收集的山藥為材料，進行擔根體蛋白質 PAGE

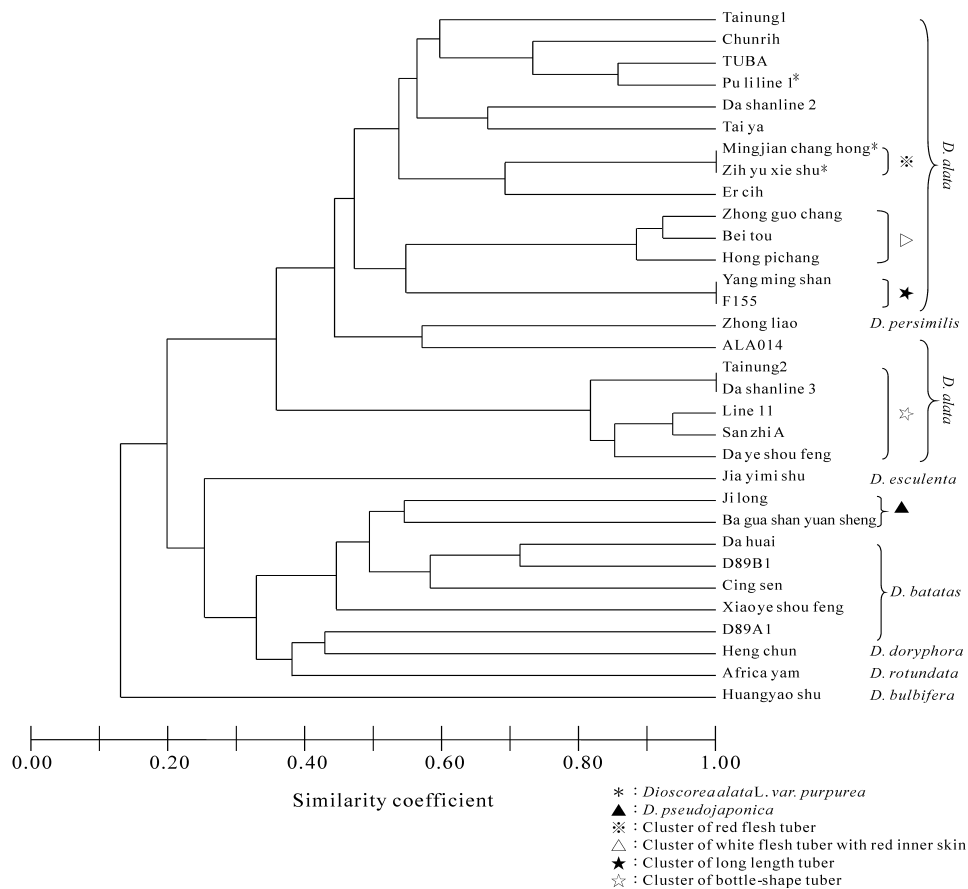


圖 4. 三十二個山藥品種（系）依據 RAPD 分子標記之群組分析結果。

Fig. 4. Cluster analysis of thirty-two yam (*Dioscorea. spp.*) varieties (lines) base on RAPD analysis.

條帶分析，*D. alata*、*D. esculenta* 及 *D. cirrhosa* 物種之蛋白質圖譜明顯與 *D. opposita* 及 *D. japonica* 不同，在 *D. opposita* 物種中，雄性品種如 Nagaimo 及 Tokkuriimo 品種無論薯塊外表形狀是否相同，其蛋白質有二個典型條帶；而雌性品種如 Ichoimo 及 Tsukuneimo 有許多蛋白質條帶，其中部份條帶與 *D. japonica* 物種條帶相似，如此結果可作為山藥分群輔助。在 DNA 分子層次方面，Asemota 等學者 (1996) 針對牙買加地區重要五個山藥物種 (*D. alata*、*D. cayensis*、*D. rotundata*、*D. trifida* 及 *D. esculenta*) 的 11 個品種進行 RAPD 分析，同一品種內不同株之間並無變異，而品種間及物種間則有相當多變異可作為牙買加地區山藥品種區別之依據。在本試驗中，RAPD 分子性狀分群的結果與外表形態分類結果相近，此外，依分群結果歸於同一種群的品種(系)，顯示其彼此之間親緣較近。Asano 及 Imagawa (1999) 進行 *D. opposita* 與 *D. japonica* 種間雜交，可獲得少數具有不成熟胚的種子，可再藉由胚培養得到部分幼苗；由田間觀察也發現小葉壽豐 (*D. batatas*) 雌性株有結實情形，而鄰近無 *D. batatas* 雄性株，基隆品系 (*D. pseudojaponica*) 可能是其授粉來源，由結實結果知此二物種親緣可能較接近，由 RAPD 分析分群結果也得到印證。然而，中寮品系明顯與 *D. alata* 物種不同，卻被依據 RAPD 分子標記之群組分析分在同一群，此一結果需要增加分子性狀數量加以釐清。

藉由外表形態明確鑑定品種頗為困難(如台農 2 號與其他品系列), 本次 RAPD 分子性狀也尚且無法提供鑑定的依據, 但部份特定品系有專一性條帶, 將進一步進行定序, 期能作為日後品種鑑定參考。此次外表形態分群結果可以在 RAPD 分析分群獲得印證, 表示每一群可依其同群特色進行多樣化育種, 現有塊狀薯群(台農 1 號)、罐形薯群(台農 2 號)、淮山藥群(花蓮 3 號)、長薯山藥群(桃園 4 號), 日後可選育紅肉山藥群品種、紅皮白肉山藥群品種、基隆山藥群品種及恆春山藥群品種等, 開發品種群特色, 可讓消費者有更明確的選擇。

引用文獻

- 劉新裕、張同吳、林義恭、陳淑芬、王昭月、朱戩良、王順成。1999。山藥之品種特性、生產潛力、物化性質與抗氧化研究。中華農業研究 48:1-22。
- 劉新裕、盧煌勝、林俊義。2000。山藥之生產與藥膳利用。農業試驗所。台中縣霧峰鄉。7 pp.
- 蔡金輝、嚴漸子、黃曉輝、葉淑靜、蔣倫偉、顧之中。1999。山藥品種資源的分類研究。江西農業大學學報 1(1):1-7。
- Abraham, K. 1998. Occurrence of hexaploid males in *Dioscorea alata* L. Euphytica 99:5-7.
- Abraham, K. and P. G. Nair. 1991. Polyploidy and sterility in relation to sex in *Dioscorea alata* L. (Dioscoreaceae). Genetica 83(2):93-98
- Agbor-Egbe, T. and S. Treche. 1995. Evaluation of the chemical composition of Cameroonian yam germplasm. J. Food Compos. Anal. 8:274-283.
- Asano, Y. and M. Imagawa. 1999. Hybrid seed formation among *Dioscorea opposita* Thunb. cvs. Nagaimo, Ichioimo, Tsukuneimo, and *Dioscorea japonica* Thunb. J. Jpn. Soc. Hortic. Sci. 68(3):591-597.
- Asemota, H. N., J. Ramser, C. Lop'ez-Peraltaet, K. Weising, and G. Kahl. 1996. Genetic variation and cultivar identification of Jamaican yam germplasm by random amplified polymorphic DNA analysis. Euphytica 92(3):341-351.
- Bindroo, B. B. and B. K. Bhat. 1986. Estimates of stability parameters in *Dioscorea deltoidea* Wall. Ann. of Bot. (Lond.) 57:299-303.
- Huang, T. C. and J. L. Hsiao. 2000. Dioscoreaceae p.87-98. in: Flora of Taiwan. Vol. 5. Second Edition. Editorial Committee of the Flora of Taiwan. Department of Botany, National Taiwan University. Taipei.
- Jaccard, P. 1908. Nouvelles recherches sur la dis distribution florale. Bull. Soc. Vaudoise Sci. Nat. 44:223-270.
- Lebot V., B. Trilles, J. L. Noyer, and J. Modesto. 1998. Genetic relationships between *Dioscorea alata* L. cultivars. Genet. Reso. Crop Evol. 45:499-509.
- Martin, F. W. 1969. The species of *Dioscorea* containing sapogenin. Economic botany 23:373-379.
- Salda V. B., L. Ramsden, M. Sun, and H. Corke. 1998. Genetic variation in physical properties of flour from selected Asian yams (*Dioscorea spp.*). Trop. Agric. 75(2):212-216.
- Sato, T. 1997. Genetic relationship among *Dioscorea* species and cultivars by rhizophore protein analysis with polyacrylamide gel electrophoresis. J. Jpn. Soc. Hortic. Sci. 66(3-4):535-541.
- Singh R. S., T. K. Bhattacharyya, and A. C. Ghosh. 1995. Diosgenin variability in plants propagated from male and female lines of *Dioscorea floribunda* Mart. & Gal. Trop. Agric. 72(2):173-174.

Study on Morphological and Molecular Markers of Yam (*Dioscorea spp.*)¹ Germplasm

Jui-Sheng Lai^{2,3}, Jui-Lung Kao², Yi-Kung Lin², Min-Fu Hu²
and Sin-Yi Liu²

Summary

Lai, J. S., J. L. Kao, Y. K. Lin, M. F. Hu, and S. Y. Liu. 2005. Study on morphological and molecular markers of yam (*Dioscorea spp.*) germplasm. J. Taiwan Agric. Res. 54:195-206.

Thirty-two yam lines of nine species, including *Dioscorea alata* L. (17 lines), *D. alata* L. var. *purpurea* (3 lines), *D. batatas* (5 lines), *D. pseudojaponica* (2 lines), *D. doryphora* (1 line), *D. esculenta* (1 line), *D. bulbifera* (1 line), *D. rotundata* (1 line) and *D. persimilis* (1 line) were used in this study. Variation among and within yam species was investigated via morphological and RAPD analysis. Forty random primers were carried out in RAPD analysis. Forty-three polymorphic bands generated by twelve primers were used in cluster analysis. The result reveals seven clusters consistent with classification yam species. *D. alata* species is the largest cluster, and can be further divided into five sub-clusters. The first sub-cluster is clumpy yam. The second sub-cluster is bottle-shape yam. The third sub-cluster is white flesh with red skin yam. The fourth sub-cluster is red flesh yam. Another one is long tuber length yam. Although it is still difficult to identify specific line within the same cluster, such a RAPD analysis corresponds with morphological analysis reveals that it is possible to proceed breeding cluster by cluster.

Key words: Yam, Morphological trait, Molecular marker.

1. Contribution No.2238 from Agricultural Research Institute, Council of Agriculture. Accepted: September 9, 2005.

2. Assistant Researcher, Assistant Researcher, Assistant Researcher, Associate Researcher and Senior Researcher respectively, Agronomy Division, ARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.

3. Corresponding author, e-mail: larry@wufeng.tari.gov.tw ; Fax: (04)23302806.