

徐海风,杨加银,程保山. 26 份菜用大豆品种(系)指纹图谱的构建及其遗传多样性分析[J]. 江苏农业科学,2014,42(5):145-148.

26 份菜用大豆品种(系)指纹图谱的构建及其遗传多样性分析

徐海风, 杨加银, 程保山

(江苏徐淮地区淮阴农业科学研究所, 江苏淮安 223001)

摘要:利用分布在大豆 20 对染色体上的 56 对 SSR 引物,对淮河以南地区 26 份菜用大豆品种(系)基因组 DNA 进行 PCR 扩增。结果表明,56 对 SSR 引物中有 44 对引物在 26 份菜用大豆之间具有稳定的多态性。利用这 44 对 SSR 引物所检测出的 123 个等位基因对 26 份菜用大豆品种(系)进行遗传相似性分析,并在 44 对引物中选择其中 6 对多态性好、扩增带型清晰的 SSR 引物构建 26 份菜用大豆品种(系)的指纹图谱。这 6 对 SSR 引物构建的指纹图谱可以将 26 份菜用大豆品种(系)逐一区分开来。采用非加权类平均法进行聚类分析,26 份菜用大豆品种(系)间遗传相似系数的变异范围为 0.61~0.88,在相似系数 0.70 处,可将 26 份菜用大豆品种(系)分为 4 大类群,分析结果在一定程度上反映了品种之间的亲缘关系。

关键词:菜用大豆;微卫星标记;指纹图谱;遗传相似性;SSR 引物

中图分类号: S643.703 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)05-0145-03

菜用大豆,俗称毛豆,通常是指豆荚鼓粒饱满,荚色、籽粒呈翠绿色,在籽粒还没有达到完全成熟,即生理上处于 R6(鼓粒盛期)至 R7(初熟期),籽粒填充达荚长 80%~90% 时采收作为蔬菜的大豆类型^[1]。新鲜菜用大豆营养丰富均衡,味道鲜美,是公认的无公害保健食品,深受亚洲国家尤其是日本及中国东南沿海地区民众的喜爱。淮河以南地区是菜用大豆的主产区之一。多年来,由于育种年限较短和资源的局限,使育成的菜用大豆品种遗传基础相对狭窄,影响了其推广开发。传统大豆品种鉴定一般采用形态标记进行,尚未对其基因 DNA 水平遗传多样性进行深入系统研究,随着育成品种种质间的相互渗透,亲缘关系越来越近,造成品种间性状差异较小,给品种的鉴定带来一定困难,不能满足育种者对拓宽品种遗传基础的需求。SSR 标记具有周期短、易操作、稳定性好、重复性高、真实可靠等优点,能够更好、更有效用于品种 DNA 指纹图谱鉴定。为了拓宽菜用大豆育种研究的遗传基础,本试验利用 SSR 标记技术对 26 份菜用大豆品种(系)进行遗传多样性分析,初步明确了品种间的亲缘关系远近,并构建了 26 份菜用大豆品种(系)指纹图谱,对深入挖掘大豆种质资源,减少亲本选配的盲目性,提高育种工作的预见性,并对品种鉴定和知识产权保护均具有一定现实意义。

1 材料与方法

1.1 材料

选择适宜淮河以南种植的具有植物学多态性的菜用大豆

收稿日期:2013-10-29

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(13)2025]。

作者简介:徐海风(1977—),男,江苏淮安人,硕士,助理研究员,主要从事作物遗传育种工作。Tel:(0517)83656807;E-mail:hanksxhf@163.com。

通信作者:杨加银,博士,研究员,主要从事作物遗传育种工作。Tel:(0517)83656807;E-mail:hynksy@163.com。

品种(系)共 26 份,供试材料由江苏徐淮地区淮阴农业科学研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 试验材料于 2011 年种植于江苏徐淮地区淮阴农业科学研究所试验基地,于开花期取新鲜健康的叶片,按照简化 CTAB 法^[2]提取基因组 DNA。

1.2.2 PCR 扩增 56 对 SSR 引物均由上海生工公司合成,SSR 标记引物序列来源于 Soybase (<http://soybase.org/resources/ssr.php>)。PCR 扩增反应在 Model My Gradient 上进行,反应体系为 10 μL,组成成分为 10 × Taq buffer、2.0 mmol/L MgCl₂、200 μmol/L dNTPs、50 ng 引物、50 ng 模板 DNA 和 1 U Taq 聚合酶。PCR 扩增程序:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 1 min,47℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 2 min,45 个循环;72℃ 延伸 10 min;最后 4℃ 或 10℃ 保存。

1.2.3 扩增产物检测 扩增产物在 8% 聚丙烯酰胺凝胶上电泳。电泳结束后用固定液(10% 乙醇,0.5% 冰乙酸)固定 2 次,每次 6 min;以 2 g/L AgNO₃ 溶液渗透 12 min;以双蒸水清洗 2 次,用 0.02 g/L 的 Na₂S₂O₃ 置代 30 s;最后用显色液(15 g/L NaOH,0.4% 甲醛溶液)显色,拍照并记载位点。

1.3 数据处理

根据 PCR 扩增结果,视每对 SSR 引物为 1 个位点,每条多态性带为 1 个等位基因;在相同的迁移位置,将观察到的每条带视为 1 个性状,有带赋值为“1”,无带赋值为“0”,缺失赋值为“9”。每 2 份材料间的遗传差异按 Nei 等的方法^[3]计算遗传相似系数(GS)和遗传距离(GD),公式为: $GS = 2M_{xy} / (M_x + M_y)$, $GD = 1 - GS$ 。式中: M_{xy} 为品种 x 和品种 y 在所有检测位点上共有片段的数目, M_x 为品种 x 在所有检测位点上的总片段数, M_y 为品种 y 在所有检测位点上的总片段数。根据遗传相似系数 GS,用非加权类平均法(UPGMA)进行遗传相似性聚类,并绘制成树状图。各项计算均在统计分析软件 NTSYS-2.10 上进行。根据 Smith 等的方法^[4]计算每

对 SSR 引物的多态性信息含量指数 (PIC), 计算公式: $PIC = 1 - \sum f_i^2$ 。式中: f_i 表示第 i 位点的等位基因频率。

2 结果与分析

2.1 SSR 标记的多态性分析

利用 56 对 SSR 引物中对 26 份大豆品种(系)进行 PCR 扩增, 结果(表 1)表明, 具有稳定多态的引物有 44 对, 共产生 123 条多态性片段。不同位点等位变异数目不等, 变化范围为 2~5 个, 平均等位变异数为 2.79 个。其中, 引物 satt146、satt197 和 satt509 的等位变异最多, 为 5 个。44 对 SSR 引物的 PIC 值变化范围为 0.074~0.697, 平均为 0.386。PIC 值的大小反映了某一对 SSR 引物对品种的鉴别能力, 它取决于检测到的等位基因数目及基因频率。不同引物鉴定品种的能力不同, 本试验中, 有 7 对引物可以将 9 份大豆品种(系)区分开来: 引物 satt197 可以将白马湖粉青豆(指纹编号: 01110, 下同)与其他 25 个品种(系)区分开来; satt243 可以将泰兴香豆(01)与其他品种(系)区分开来; satt384 可以将肖县大黑豆(010)与其他品种(系)区分开来; satt568 可以将日本大黑豆(110)与其他品种(系)区分开来; satt713 可以将宁镇 1 号(110)与其他品种(系)区分开来; satt146 可以将淮研香豆(1100)、淮豆 10 号(1011)与其他品种(系)区分开来; satt235 可以将南京毛豆(10)、海系 13(11)与其他品种(系)区分开来; 其他 37 个引物单独使用时, 不能鉴别出 26 份菜用大豆品种(系)中的任何一个。

表 1 SSR 引物、染色体位置、等位基因数目及多态性信息含量指数

引物	等位基因 数目(个)	染色体	PIC 值	引物	等位基因 数目(个)	染色体	PIC 值
satt449	3	A1	0.561	satt235	2	G	0.137
satt591	3	A1	0.576	satt568	3	H	0.518
satt470	3	A2	0.625	satt442	2	H	0.494
satt424	3	A2	0.565	satt181	2	H	0.498
satt453	3	B1	0.658	satt239	2	I	0.355
satt197	5	B1	0.697	sat_420	2	I	0.494
satt509	5	B1	0.690	sat_412	2	J	0.498
satt687	2	B2	0.231	satt242	2	K	0.488
satt556	2	B2	0.422	satt247	2	K	0.401
satt122	2	B2	0.491	sat_167	3	K	0.618
satt467	3	B2	0.627	satt725	4	K	0.673
satt577	4	B2	0.672	sat_099	2	L	0.133
satt565	2	C1	0.285	satt229	2	L	0.311
satt396	2	C1	0.500	satt156	2	L	0.459
satt713	3	C1	0.519	satt346	2	M	0.497
satt384	3	E	0.074	satt308	3	M	0.638
satt706	2	E	0.393	satt463	4	M	0.495
satt716	3	E	0.483	satt655	3	M	0.595
satt268	4	E	0.618	satt257	3	N	0.639
satt252	3	F	0.444	satt339	3	N	0.664
satt348	3	F	0.631	satt243	2	O	0.074
satt146	5	F	0.536	satt173	3	O	0.634

2.2 6 对核心引物构建的菜用大豆 SSR 指纹图谱

由于试验中单个引物仅能区分出少数品种, 为鉴别出 26 份菜用大豆品种(系), 经过筛选后, 依据在染色体上分布均匀、带型清晰、多态性丰富以及杂带少等主要原则, 确定 6 个

标记作为构建指纹图谱的核心引物, 在相同的迁移位置上, 以 (1,0) 标记扩增片段的有无, 构建了 26 份菜用大豆品种(系)的 DNA 指纹图谱(表 2)。从这 6 对 SSR 引物在 26 份品种(系)中共扩增出 19 个多态性片段, 平均每个位点检测到 3.17 个等位基因, 变化范围为 2~5 个。利用这 6 对 SSR 引物的指纹图谱组合, 能够很好区分 26 份品种(系)。6 对引物的特异带型组合即构成某一品种的 DNA 指纹图谱, 根据所构建的指纹图谱, 可以对某一品种的真实性进行鉴定。

2.3 基于 SSR 标记的菜用大豆遗传相似性分析

利用 44 对 SSR 引物所检测出的 123 个位点, 对 26 份菜用大豆品种(系)进行聚类分析, 得到聚类树状图(图 1)。大部分供试品种(系)间的遗传变异较小, 遗传相似系数的变异范围为 0.61~0.88。以遗传相似系数 0.70 为阈值可以将 26 份品种(系)分为 4 个群, 第一群只有金湖螺丝豆; 第二群有南农菜豆 5 号、大粒 2 号、日本大黑豆、肖县大黑豆、睢宁大青豆、海系 13、金湖大菜豆、南京毛豆、宿迁红管豆、临河大粉青、泰兴香豆、涟水岔庙黑豆、南通乌豆、台湾 292、南农 95C13、皖引乌豆、通黄 2 号、淮阴大青豆、淮 292、白马湖粉青豆、淮阴青豆、淮豆 10 号; 第三群只有宁镇 1 号; 第四群有楚秀和楚秀 2 号。以遗传相似系数 0.74 为阈值又可以将第二群分为 5 个亚群, 南农菜豆 5 号和大粒 2 号聚为第一亚群; 日本大黑豆、肖县大黑豆、睢宁大青豆、海系 13、金湖大菜豆、南京毛豆、宿迁大粒豆聚为第二亚群; 临河大粉青、涟水岔庙黑豆、泰兴香豆、南通乌豆聚为第三亚群; 台湾 292、南农 95C13 聚为第四亚群; 皖引乌豆、通黄 2 号、淮阴大青豆、淮 292、白马湖粉青豆、淮阴青豆、淮豆 10 号聚为第五亚群。

3 讨论

国际上对菜用大豆的育种工作开始于 1976 年, 20 世纪 90 年代得到重点发展^[5]。20 世纪 40 年代末, 中国台湾开始菜用大豆的生产, 育成了一批优质菜用大豆品种, 如台湾 290、台湾 292、台湾 75 等。20 世纪 80 年代以后菜用大豆成为中国台湾农产品出口量第一的作物。日本是开展菜用大豆育种较早的国家之一, 已选育出许多优良品种。中国大陆直到 20 世纪 80 年代改革开放后, 才开始从中国台湾、日本等地引进菜用大豆品种。目前生产上应用的品种多是从日本、中国台湾、亚洲蔬菜研究与发展中心(AVRDC)引进的^[6]。

我国现已成为世界上最大的菜用大豆生产国和出口国, 但菜用大豆的品种仍然以从日本和中国台湾地区引进的品种为主, 再加上连年种植和频繁引种, 导致种性退化和发病严重。南方省市的育种单位虽已培育出一些菜用大豆新品种, 但大多数仍是引进品种或从引进品种中系统选育而来, 菜用豆遗传基础很狭窄。

本研究中 26 份菜用大豆品种(系)的聚类分析结果表明, 其遗传相似系数在 0.61~0.88 之间, 绝大多数品种间表现了较小的遗传差异, 差异最小的为南京毛豆、金湖大菜豆, 遗传相似系数为 0.88; 26 个菜用大豆品种(系)中有 22 个品种(系)聚在第二群。同时, 从聚类图(图 1)可以看出, 地理位置近的品种多聚在相同类群, 如江苏徐淮地区淮阴农业科学研究所选育的淮阴香豆和楚秀都聚在第四群; 江苏淮安及周边的菜用大豆选育品种及地方品种如淮豆 10 号、淮 292、

表 2 6 对 SSR 引物构建的 26 份菜用大豆品种(系)的 SSR 指纹图谱

编号	品种(系)名称	引物名称及指纹编号					
		satt336	satt706	satt308	satt339	satt725	satt197
1	淮 292	0 1	1 0	0 1 1	0 1 1	1 0 1 0	0 1 0 0 0
2	淮豆 10 号	1 0	1 0	0 1 0	0 1 1	1 1 1 0	1 1 0 0 0
3	楚秀 2 号	1 0	0 1	0 1 0	1 0 1	1 0 1 0	0 1 0 0 0
4	楚秀	1 0	0 1	0 1 0	1 0 1	1 0 1 0	1 0 0 0 0
5	淮阴青豆	0 1	0 1	1 1 0	1 0 1	1 1 1 0	1 1 0 1 0
6	淮阴大青豆	0 1	1 0	1 1 0	0 1 0	1 1 1 0	1 1 0 0 1
7	宁镇 1 号	1 0	1 0	1 0 0	0 1 1	1 0 1 1	0 1 0 1 0
8	南农 95C13	1 0	1 0	0 0 1	1 0 1	1 0 1 1	1 1 0 0 0
9	南京毛豆	0 1	1 0	1 1 1	1 0 1	1 0 1 0	0 1 0 0 1
10	白马湖粉青豆	0 1	1 0	0 1 0	0 1 0	0 0 1 0	0 1 1 1 0
11	南通乌豆	0 1	1 0	1 0 0	0 1 0	1 1 1 0	0 1 0 1 0
12	金湖螺丝豆	0 1	1 0	1 0 0	1 0 1	1 1 1 0	1 1 0 1 0
13	宿迁大粒豆	1 0	1 0	1 1 0	0 1 0	1 0 1 1	0 1 0 1 0
14	涟水岔庙黑豆	0 1	1 0	1 0 0	1 0 1	1 0 1 1	0 1 0 1 0
15	泰兴香豆	0 1	1 0	1 0 0	0 1 0	1 0 1 0	0 1 0 1 0
16	大粒 2 号	1 0	1 0	0 1 0	1 0 1	1 0 1 0	1 1 0 0 0
17	通黄 2 号	0 1	1 0	1 1 1	0 1 0	1 0 1 0	0 1 0 0 1
18	海系 13	0 1	1 0	1 1 1	1 0 1	1 0 1 1	0 1 0 1 1
19	金湖大菜豆	1 0	1 0	1 1 1	1 0 1	1 0 1 0	0 1 0 0 1
21	睢宁大青豆	1 0	0 1	1 1 1	0 1 0	1 0 1 1	1 1 0 0 0
20	南农菜豆 5 号	1 0	1 0	0 1 0	1 0 1	1 0 1 1	1 1 0 0 0
22	临河大粉青	0 1	1 0	1 0 1	0 1 0	1 0 1 0	0 1 0 1 1
23	皖引乌豆	0 1	1 0	0 1 0	0 1 0	1 0 1 0	0 1 0 0 1
24	肖县大黑豆	1 0	0 1	1 0 0	0 1 0	1 0 1 1	1 1 0 0 0
25	日本大黑豆	1 0	0 1	1 0 0	1 0 1	1 0 1 1	0 1 0 1 0
26	台湾引进豆	0 1	0 1	1 0 0	0 1 0	1 0 1 1	1 1 0 0 0

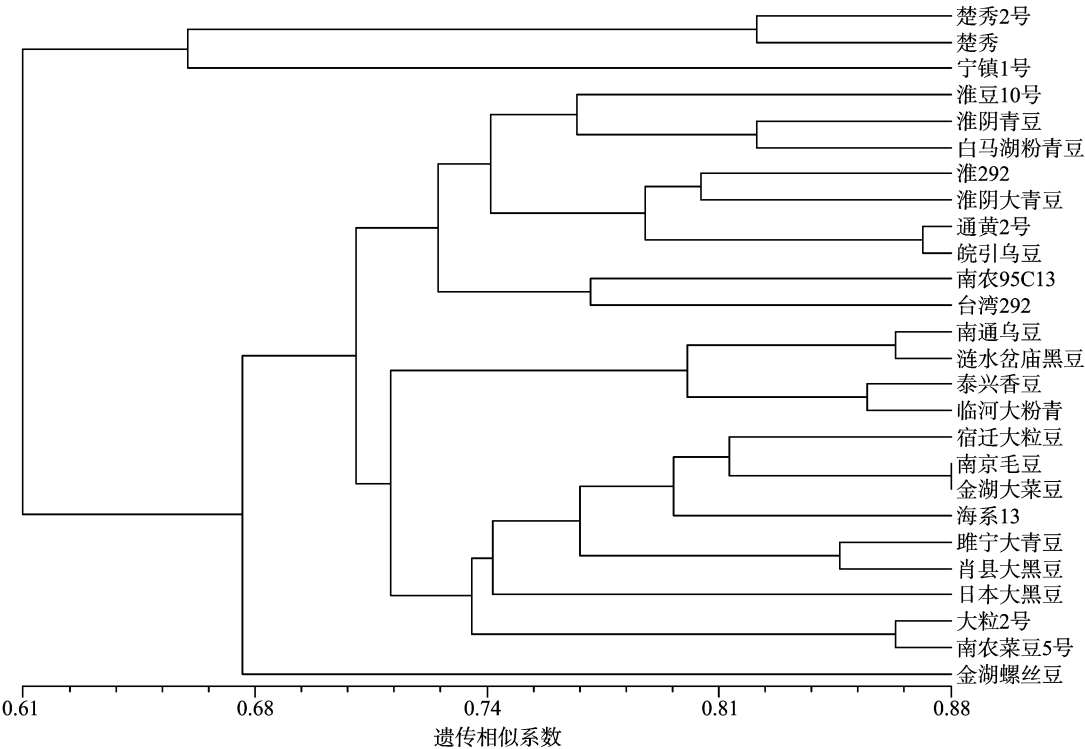


图1 26份菜用大豆品种(系)的 SSR 聚类图

周玉明. 湿地型生态农业观光园规划设计——以苏州澄湖生态农业观光园为例[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(5): 148–150.

湿地型生态农业观光园规划设计 ——以苏州澄湖生态农业观光园为例

周玉明

(苏州大学艺术学院环境设计系, 江苏苏州 215000)

摘要:结合苏州澄湖生态农业观光园案例研究湿地型生态农业观光园的规划问题。在明确营建目标的基础上, 提出规划理念, 进行方案总体构思和功能分区, 并对项目涉及的专项规划提出建议。

关键词:湿地; 生态农业观光园; 规划

中图分类号: TU986.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2014)05–0148–03

生态农业观光园是在划定的范围内, 以农业为依托, 运用生态学原理和系统科学、环境美学的方法, 合理地开发利用农业资源, 把农业生产经营活动和发展观光休闲结合起来, 融环境保护、农业生产、展示、经营、生态旅游观光、健身、度假、书画摄影、教育等内容于一体的综合园区^[1–2]。因基地环境条件不同, 生态农业观光园可分为各种不同类型, 湿地型生态农业观光园建于湿地环境, 与其他类型生态农业观光园相比, 在规划目标、规划理念、总体构思、功能分区、专项规划等方面有共同之处, 也有其自身的特点。

1 项目概述与基地现状

苏州澄湖生态农业观光园是江苏省苏州市吴中区为推动

角直镇生态农业的发展, 改善环境, 并发展旅游业而决定成立。角直镇区位优势突出, 地理位置优越, 历史人文深厚, 生态环境优美, 是中国历史文化名镇、中国特色景观旅游名镇, 素有“五湖之汀”“六泽之冲”之称, 也被誉为“神州水乡第一镇”。

本项目位于角直镇车坊片区, 占地面积 19 km², 基地紧依 45 km² 的澄湖, 沿湖西侧展开, 滨湖风光诱人。规划范围内地势平坦, 主要由河网、鱼塘、农田、林地、道路、住宅、寺庙等用地构成, 其中河网、鱼塘面积较大, 农田则大面积种植水生蔬菜“水八仙”(指茭、茼蒿、水芹、莼菜、慈姑、荸荠、菱、莲藕), 湿地特征明显。

2 规划目标与理念

根据基地现状及资源条件, 苏州澄湖生态农业观光园规划确定的目标是以保护和改善湿地环境为前提, 以精神原乡为主题, 选择以“水”“农”“渔”为主体的民间生活文化, 逐步形成集特色农产品生产、加工、销售和生态农业观光、旅游于

数据库的品种数量, 同时还要增加构建图谱的 SSR 引物数目, 从而使数据库数据更加完善, 以满足分析研究需要。

参考文献:

- [1] Konovsky J, Lumpkin T A, Mc C D. Edamame; the vegetable soybean [M]. Binghamton; Haworth Press, 1994: 173–181.
- [2] 楼巧君, 陈亮, 罗利军. 三种水稻基因 DNA 快速提取法的比较[J]. 分子植物育种, 2005, 3(5): 749–752.
- [3] Nei M, Li W. Mathematical mode for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76: 5269–5273.
- [4] Smith J S C, Chen E C L, Shu H, et al. An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.): Comparisons with data from RFLPS and pedigree [J]. Thero Appl Genet, 1997, 95: 163–173.
- [5] 韩立德, 盖钧镒, 邱家驹. 菜用大豆品质模糊综合评判方法[J]. 大豆科学, 2002, 21(4): 274–277.
- [6] 袁凤杰, 俞琦英, 朱申龙. 菜用大豆品质和产量性状的评述[J]. 浙江农业科学, 2001(1): 1–4.

收稿日期: 2013–08–14

作者简介: 周玉明(1964—), 男, 江苏张家港人, 硕士, 副教授, 主要研究方向为景观设计。Tel: (0512) 68253608; E-mail: szkuangao@163.com。

淮阴大青豆、白马湖粉青豆、淮阴青豆均聚在第二群第五亚群; 南京及周边地区的南京毛豆、金湖大菜豆、海系 13 等品种(系)均聚在第二群第二亚群。长期以来, 由于大豆品种改良主要集中于当地适应品种或品系间杂交, 并且同一育种地区及各育种单位集中化利用亲本, 造成了大豆品种遗传基础过于狭窄。从聚类图(图 1)发现, 金湖螺丝豆与别的品种(系)有较大的遗传差异, 这可能是因为螺丝豆的表皮是黑黄相间的, 与其他品种(系)差异较大; 宁镇 1 号与其他品种(系)有较大的遗传差异的原因可能是因为宁镇 1 号是春播品种, 而其余大多数是夏播品种。大豆育种中应该注重跨地域引种, 推广不同育种单位不同时期育成的新品种, 有利于保持大豆品种的遗传多样性, 防范品种遗传背景单一。

本研究初步构建了 26 份菜用大豆品种(系)的 DNA 指纹图谱数据库, 并对其遗传多样性进行分析, 明确品种间的亲缘关系远近, 为今后的育种工作提供理论依据。本研究还发现 6 对核心引物可以将这 26 份菜用大豆品种(系)一一区分开来, 可用于品种鉴定和新品种保护。

随着育成新品种的不断出现, 需要不断增加指纹图谱数