

基于 SRAP 分子标记的剑豆遗传多样性分析

刘明骞¹ 陈丽君² 丁美美¹ 欧阳昆唏¹ 惠文凯¹ 李俊成¹ 陈晓阳^{1*}

(1. 华南农业大学 林学院/广东省森林植物种质创新与利用重点实验室, 广州 510642;

2. 华南农业大学 教学科研基地管理中心, 广州 510642)

摘要 采用相关序列扩增多态性(Sequence-related amplified polymorphism, SRAP)分子标记方法,对收集到的来源于11个国家的19个剑豆种群进行遗传多样性分析。结果表明:1)在扩增出的274条清晰条带中,具有多态性的有144条,占总数的52.6%;2)28对引物的多态性指数(Polymorphism information content, PIC)介于0.16~0.43,平均值为0.28;3)剑豆总遗传多样性指数(Ht)为0.2856,基因流(Nm)为0.0656;4)通过分子方差分析(Analysis of molecular variance, AMOVA)发现,剑豆种群间差异占总差异的88%,种群内差异占总差异的12%,种群间差异为剑豆差异的主要来源;5)主坐标分析(Principal coordinates analysis, PCoA)和基于遗传距离的聚类分析表明,19个剑豆种群可分为5个类群,每个类群均有不同的表型。

关键词 剑豆;相关序列扩增多态性;遗传多样性

中图分类号 Q 37

文章编号 1007-4333(2015)02-0058-09

文献标志码 A

Genetic diversity of *Canavalia ensiformis* (L.) DC. accessions revealed by SRAP markers

LIU Ming-qian¹, CHEN Li-jun², DING Mei-mei¹, OUYANG Kun-xi¹,
HUI Wen-kai¹, LI Jun-cheng¹, CHEN Xiao-yang^{1*}

(1. College of Forestry/Guangdong Key Laboratory for Innovative Development and Utilization of Forest Plant Germplasm,
South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2. Center for Teaching & Research Base, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract *Canavalia ensiformis* is an under-exploited legume that has been used as forage, green manure and cover crop. It can potentially be used in numerous other ways, including nutraceuticals and phytopharmaceuticals. In this study, sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers were used to assess the genetic diversity and relationship of 19 *C. ensiformis* accessions originated from 11 countries. The results showed that: 1) In total, 274 clear bands were amplified and 144 fragments (52.6%) were polymorphic; 2) The polymorphism information content (PIC) values ranged from 0.16 to 0.43, with an average of 0.28; 3) The total genetic diversity (Ht) was 0.2856, the estimate of gene flow (Nm) was 0.0656; 4) The results from the analysis of molecular variance (AMOVA) revealed that the most significant variation, 88% of the total variation, occurred among accessions and 12% was attributed to within accession variation; 5) The cluster analysis and principal coordinates analysis (PCoA) produced similar results, whereby the 19 *C. ensiformis* were divided into five clusters, each cluster was composed of different accessions and had different phenotypic traits. This study provided the theoretical basis for biodiversity studies and breeding programs of *Canavalia ensiformis*.

Key words *Canavalia ensiformis*; sequence-related amplified polymorphism (SRAP); genetic diversity

收稿日期: 2014-05-31

基金项目: 广州市科技计划项目(2010Z1-E241); 农业部“948”项目(2011-Z50)

第一作者: 刘明骞, 博士研究生, E-mail: liumq0123@163.com

通讯作者: 陈晓阳, 教授, 主要从事林木遗传育种和生物技术研究, E-mail: xychen@scau.edu.cn

剑豆(*Canavalia ensiformis* (L.) DC.), 英文名 Jack bean 或 Sword bean, 为豆科刀豆属植物。据考古发现, 该物种最早起源于美洲, 公元前 3 000 年墨西哥就有种植^[1], 现广泛分布于美国西南部、拉丁美洲、非洲和印度西部等热带、亚热带地区, 在我国长江流域及以南各省有零星栽培^[2]。因形似古代刀剑, 故称剑豆或洋刀豆、海刀豆。

剑豆具有很强的适应能力, 耐盐、耐干旱、耐贫瘠, 且根系和根瘤发达, 是重要的绿肥植物和覆草植物^[3-5]。剑豆营养丰富, 富含蛋白质、必需氨基酸和矿物质等营养物质^[6-7]。为卫生部公布的第一批“药食兼用食品”, 具有上乘的保健疗效功能^[8]。剑豆始载于《救荒本草》, “其味甘, 性温, 归胃、大肠、肾经, 温中, 下气, 益肾, 可用于治疗虚寒呃逆呕吐, 肾虚腰痛”^[9]。《本草纲目》^[10]中记载, 剑豆具有“温中下气, 利肠胃, 止呃逆, 益肾补元”的功效。在 20 世纪 70 年代, 剑豆就被美国科学院认为是热带地区潜在的食物来源^[11]。2008 年联合国开发计划署把剑豆的开发利用作为非洲援助项目, 以补充非洲国家的粮食和饲料。亚洲东部和南部地区, 人们常将其作为蔬菜或饲料添加使用, 在一些牲畜的饲料中添加 20% 左右剑豆种子粉末作为高蛋白饲料, 现已成功用于兔子、鱼和鸡等的饲料^[12-13]。剑豆种子中的刀豆蛋白 A 和脲酶等物质是应用十分广泛的工业和化工原料。

相关序列扩增多态性 (Sequence-related amplified polymorphism, SRAP) 是一种基于 PCR 的标记系统, 由美国加州大学 Li 等^[14]于 2001 年在研究芸苔属植物时开发出来的一种新的标记。该标记通过独特设计的正、反向引物优先对基因组 DNA 的开放性阅读框进行特异性扩增, 正向引物长 17 bp, 对外显子区域进行扩增, 反向引物长 18 bp, 对内含子和启动子区域进行特异扩增。其多态性主要产生于 2 个方面: 一是由于插入、缺失导致的片段大小的变化从而产生共显性标记; 二是由于核苷酸突变产生的显性标记^[15]。该标记具有简便、高效、产率高、高共显性、重复性好、易测序和便于克隆目标片段的特点, 目前已被广泛应用于大豆、油茶、杨树、松树和洋麻等植物遗传多样性分析、品种鉴定、QTL 定位以及遗传图谱的构建等方面的研究^[16]。

现国内外对于剑豆的研究大多集中于刀豆蛋白 A 的提取、药用功能、如何去除剑豆毒性以及剑豆种子的喂养试验等方面, 剑豆的引种、良种评价及选育

等方面研究得很少, 在分子水平对其进行多样性分析和种群评价的还未见报道。本研究以来源于 11 个国家的 19 个种群为研究对象, 拟采用 SRAP 分子标记对其多样性进行分析及分类, 旨在为剑豆的种群采集、分析评价和育种选择提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

从澳大利亚热带作物和饲料研究中心 (Australian Tropical Crops and Forages Collection, AusTRCF) 引进的以及从中国广西、湛江、海南 3 个省份和巴西采集的不同种群的剑豆 (表 1) 种植于广州市华南农业大学教学科研基地苗圃, 苗圃位于北纬 23°09'50"、东经 113°21'60", 地处南亚热带, 属南亚热带典型的季风海洋气候, 全年平均气温为 20~22 °C, 日均气温都在 0 °C 以上, 雨量充沛, 年降水量为 1 689.3~1 876.5 mm, 雨季为 4—9 月, 降水量占全年的 85% 左右。

表 1 剑豆种群材料

Table 1 Accessions of *C. ensiformis*

编号 No.	名称 Name	来源 Source	原产地 Origin
1	CHN1	collected	中国广东
2	CHN2	collected	中国广西
3	PI 487475	AusTRCF	伊拉克
4	210	AusTRCF	巴拉圭
5	NT 576	AusTRCF	N/A
6	Tce 1	AusTRCF	尼日利亚
7	NT 3073	AusTRCF	哥伦比亚
8	NT 3074	AusTRCF	哥伦比亚
9	CPI 50103	AusTRCF	委内瑞拉
10	CPI 58560	AusTRCF	委内瑞拉
11	PI 358592	AusTRCF	埃塞俄比亚
12	BN-13474-63	AusTRCF	苏丹
13	PI 470242	AusTRCF	印度尼西亚
14	PI 279593	AusTRCF	菲律宾
15	B1	collected	巴西
16	B2	collected	巴西
17	B3	collected	巴西
18	CHN3	collected	中国海南
19	CHN4	collected	中国广西

1.2 DNA提取及测定

每个种群随机采取10株生长状况良好的苗木嫩叶,每株的叶片单独存放,放入液氮中速冻。 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。采用改良的CTAB法提取每株剑豆叶片的总DNA^[17],用核酸/蛋白快速检测仪(Thermo Nanodrop 1000)检测DNA浓度和纯度,然后将DNA质量浓度稀释为 $50\text{ ng}/\mu\text{L}$, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 贮存备用。

采用6个不同种群的剑豆DNA通过正交试验设计建立并优化剑豆SRAP-PCR最佳反应体系

($25\text{ }\mu\text{L}$)为:DNA 50 ng , Mg^{2+} $3.0\text{ mmol}/\mu\text{L}$, dNTPs $0.15\text{ mmol}/\mu\text{L}$, *Taq* DNA聚合酶 $0.06\text{ U}/\mu\text{L}$, 引物 $0.48\text{ }\mu\text{mol}/\mu\text{L}$ 。SRAP-PCR反应程序为: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性1 min, $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 复性1 min, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸1 min,5个循环; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性1 min, $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 复性1 min, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸1 min,30个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸10 min^[14]。每个种群选取1株样品的DNA进行引物的筛选,从783对引物中筛选出28对条带清晰、多态性较好的引物对(表2)用于扩增所有种群的190个单株。

表2 SRAP引物序列

Table 2 Sequence of SRAP primers

正向引物 Forward primer		反向引物 Reverse primer	
名称 Name	序列(5'-3') Sequence(5'-3')	名称 Name	序列(5'-3') Sequence(5'-3')
Me1	TGAGTCCAAACCGGATA	Em1	GACTGCGTACGAATTAAT
Me2	TGAGTCCAAACCGGAGC	Em2	GACTGCGTACGAATTTGC
Me3	TGAGTCCAAACCGGAAT	Em3	GACTGCGTACGAATTGAC
Me4	TGAGTCCAAACCGGACC	Em4	GACTGCGTACGAATTTGA
Me5	TGAGTCCAAACCGGAAG	Em5	GACTGCGTACGAATTAAC
Me6	TGAGTCCAAACCGGTAA	Em6	GACTGCGTACGAATTGCA
Me7	TGAGTCCAAACCGGTCC	Em7	GACTGCGTACGAATTGAG
Me8	TGAGTCCAAACCGGTGC	Em8	GACTGCGTACGAATTGCC
Me9	TGAGTCCAAACCGGACA	Em9	GACTGCGTACGAATTTCA
Me10	TGAGTCCAAACCGGACG	Em10	GACTGCGTACGAATTCAA
Me11	TGAGTCCAAACCGGACT	Em11	GACTGCGTACGAATTGCA
Me12	TGAGTCCAAACCGGAGG	Em12	GACTGCGTACGAATTCAT
Me13	TGAGTCCAAACCGGAAA	Em13	GACTGCGTACGAATTCTA
Me14	TGAGTCCAAACCGGAAC	Em14	GACTGCGTACGAATTCTC
Me15	TGAGTCCAAACCGGAGA	Em15	GACTGCGTACGAATTCTT
Me16	TGAGTCCAAACCGGTAG	Em16	GACTGCGTACGAATTGAT
Me17	TGAGTCCAAACCGGCAT	Em17	GACTGCGTACGAATTATG
Me18	TGAGTCCAAACCGGTTG	Em18	GACTGCGTACGAATTAGC
Me19	TGAGTCCAAACCGGTGT	Em19	GACTGCGTACGAATTACG
Me20	TGAGTCCAAACCGGTCA	Em20	GACTGCGTACGAATTTAG
Me21	TGAGTCCAAACCGGGCA	Em21	GACTGCGTACGAATTTCTG
Me22	TGAGTCCAAACCGGATG	Em22	GACTGCGTACGAATTGTC
Me23	TGAGTCCAAACCGGGAT	Em23	GACTGCGTACGAATTGGT
Me24	TGAGTCCAAACCGGGCT	Em24	GACTGCGTACGAATTCAG
Me25	TTCAGGGTGGCCGGATG	Em25	GACTGCGTACGAATTCTG
Me26	TGGGACAACCCGGCTT	Em26	GACTGCGTACGAATTCGG
Me27	TGAGTCCAAACCGGATC	Em27	GACTGCGTACGAATTCCA
		Em28	GACTGCGTACGAATTCGA
		Em29	GACTGCGTACGAATTATT

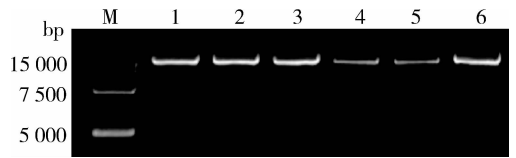
1.3 数据分析

将扩增的产物用 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 银染后读带。选取电泳凝胶图谱上 100~1 500 bp 清晰的条带进行统计, 可辨认的清晰条带记录为“1”, 空缺时记录为“0”, 生成“0”和“1”组成的原始矩阵。同一对引物不同胶板以标准分子量 DNA、特征带和公共带相对应, 找到相对应的条带。用 POPgene 32 软件计算各个种群的遗传多样性指数、总遗传多样性、基因流、Nei's 遗传距离和遗传一致度^[18]。用 NTsys 2.1 统计分析软件 SAHN Clustering 模块进行非加权成对算术平均法 (Unweighted pair group method with arithmetic mean, UPGMA) 聚类分析, 构建聚类图^[19]。用 GenAIEx 6.5 软件进行分子方差分析 (Analysis of molecular variance, AMOVA) 和主坐标分析 (Principal coordinates analysis, PCoA)^[20]。

2 结果与分析

2.1 DNA 质量鉴定

采用改良 CTAB 法提取剑豆基因组 DNA, 经琼脂糖凝胶电泳检测, 主带清晰明显, 如图 1 所示。紫外分光光度计检测结果为: D_{260}/D_{280} 的值为 1.8~2.0, $D_{260}/D_{230} > 2.0$, 说明 DNA 质量较好, 可以用于后续的 SRAP-PCR 反应。



M 为 marker, 1~6 分别为中国、哥伦比亚、巴西、以色列、巴拉圭和尼日利亚的 6 个剑豆种群 DNA。

M: Marker; 1-6: Genomic DNA of *C. ensiformis* accessions originating from China, Columbia, Brazil, Iraq, Paraguay and Nigeria, respectively.

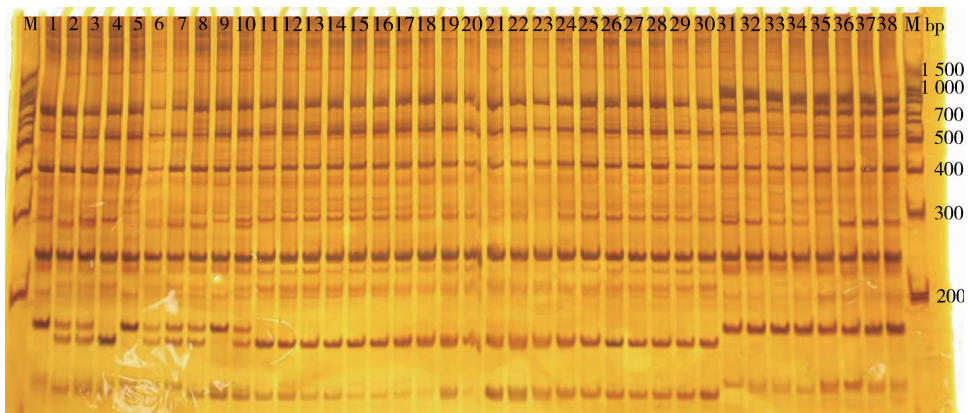
图 1 6 个剑豆种群基因组 DNA 电泳图

Fig. 1 Electrophoresis picture of DNA of 6 *C. ensiformis* accessions

2.2 引物扩增结果

28 对引物共扩增出 274 条清晰的条带, 其中 144 条具有多态性, 占总条带数的 52.6%, 其中 Me21/Em18 引物对的扩增效果如图 2 所示。每对引物所扩增的总条带数、多态性条带数、多态性条带数所占比例和反应引物对扩增能力的多态性指数 (Polymorphism information content, PIC) 详见表 3。

由表 3 可以看出, 28 对引物中每对引物扩增的总条带数为 3~20 条, 平均为 10 条左右, 引物对 Me11/Em13 扩增的条带数最少, Me20/Em27 扩增的条带数最多; 引物对 Me2/Em5、Me11/Em13、Me11/Em27 和 Me13/Em26 扩增的多态性条带最少, 均为 2 条, Me26/Em19 扩增的多态性条带最多, 有 12 条; 平均为 5.14 条; 多态性条带的比例从 21% (Me4/Em7)~88% (Me14/Em13), 平均值为 54%。



两侧泳道为 Marker (100 bp DNA ladder)。泳道 1~10 为种群 1 的 10 个单株; 泳道 11~20 为种群 2 的 10 个单株; 泳道 21~30 为种群 3 的 10 个单株; 泳道 31~38 为种群 4 的 8 个单株。

1-10, 10 plants of accession 1; 11-20, 10 plants of accession 2; 21-30, 10 plants of accession 3; 31-38, 8 plants of accession 4; M, DNA marker (100 bp DNA ladder).

图 2 引物对 Me21/Em18 扩增产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Fig. 2 Amplified pattern on polyacrylamide gel with primer combinations of Me21/Em18

表3 引物对多态性条带数目和多态性信息指数
Table 3 Polymorphism number and PIC of 28 SRAP primer combinations

引物对 Primer combination	扩增条带数 Total number of bands	多态性条带数 Number of polymorphic bands	多态性条带比例/% Percentage of polymorphic bands	多态性信息指数 PIC
Me1/Em24	9	5	56	0.27
Me2/Em3	10	8	80	0.34
Me2/Em5	6	2	33	0.36
Me2/Em10	10	7	70	0.24
Me3/Em2	11	6	55	0.27
Me4/Em7	14	3	21	0.19
Me5/Em3	17	4	24	0.26
Me7/Em7	10	6	60	0.32
Me8/Em16	10	3	30	0.28
Me11/Em13	3	2	67	0.29
Me11/Em27	6	2	33	0.16
Me13/Em15	6	4	67	0.38
Me13/Em26	7	2	29	0.35
Me14/Em13	8	7	88	0.30
Me14/Em28	8	4	50	0.23
Me15/Em6	11	7	64	0.25
Me16/Em5	7	5	71	0.25
Me20/Em18	9	4	44	0.26
Me20/Em26	10	7	70	0.23
Me20/Em27	20	7	35	0.35
Me21/Em23	17	8	47	0.41
Me24/Em27	5	3	60	0.38
Me24/Em29	6	3	50	0.30
Me25/Em27	13	8	62	0.33
Me26/Em13	8	4	50	0.12
Me26/Em19	16	12	75	0.24
Me26/Em27	10	5	50	0.19
Me27/Em28	7	6	86	0.43
总计 Total	274	144		
平均 Mean	9.79	5.14	54	0.28

PIC 用来衡量不同引物对反应多态性高低的程度, 范围为 0.12 (Me26/Em13) ~ 0.43 (Me27/Em28), 平均值为 0.28。引物对 Me27/Em28 和 Me21/Em23 的 PIC 值最高, 说明其对剑豆各种群的分离效果最好。

2.3 剑豆遗传多样性

剑豆总遗传多样性指数 H_t 为 0.285 6, 基因流 N_m 为 0.065 6, 说明剑豆不同种群间基因交流非常少。由剑豆不同种群的遗传多样性参数(表 4)可以看出, 各种群多样性位点的数目(N_p)为 2~72, 平均值为 13.16; 多态性位点所占百分率(P_p)为 1.39%~

50%, 平均值为 7.00%; 观测到的总基因数(N_a)为 1.01~1.50, 平均值为 1.09; 有效等位基因数(N_e)为 1.01~1.37, 平均值为 1.06; Nei's 遗传多样性指数(H)为 0.01~0.21, 平均值为 0.03; Shannon's 信息指数处于 0.01~0.30, 平均值为 0.05。19 个种群的 Nei's 多样性指数和 Shannon's 信息指数的平均值均很小, 说明综合来讲, 剑豆种群内的多样性较小, 应注重种群选择。相对其他种群, 种群 CHN1 的各项参数都最大, 其次为种群 210, 说明这 2 个种群种群内差异较大, 要注重对种群选择和单株选择的结合。

表 4 19 个剑豆种群的遗传多样性指数

Table 4 Genetic diversity parameters of 19 *C. ensiformis* accessions

序号 No.	多态性位点 数目(N_p) Number of polymorphic loci	多态性位点 百分比(P_p)/% Percentage of polymorphic loci	等位基因观 测数(N_a) Observed number of alleles	有效等位基 因数(N_e) Effective number of alleles	Nei's (1973) 遗传多样性(H) Nei's (1973) gene diversity	Shannon's 多样性指数 (I) Shannon's information index
1	72	50.00	1.50±0.50	1.37±0.42	0.21±0.22	0.30±0.31
2	7	4.86	1.05±0.22	1.03±0.14	0.01±0.08	0.02±0.12
3	2	1.39	1.01±0.12	1.01±0.09	0.01±0.05	0.01±0.07
4	43	29.86	1.30±0.46	1.20±0.36	0.11±0.19	0.17±0.27
5	29	20.14	1.20±0.40	1.10±0.25	0.06±0.14	0.10±0.21
6	4	2.78	1.03±0.16	1.01±0.06	0.01±0.04	0.01±0.07
7	7	4.86	1.05±0.22	1.03±0.15	0.02±0.08	0.03±0.12
8	24	16.67	1.17±0.37	1.10±0.26	0.06±0.14	0.08±0.20
9	12	8.33	1.08±0.28	1.07±0.24	0.04±0.13	0.05±0.18
10	5	3.47	1.03±0.18	1.02±0.13	0.01±0.07	0.02±0.11
11	4	2.78	1.03±0.16	1.01±0.10	0.01±0.05	0.01±0.08
12	3	2.08	1.02±0.14	1.01±0.10	0.01±0.06	0.01±0.08
13	5	3.47	1.03±0.18	1.02±0.14	0.01±0.08	0.02±0.11
14	2	1.39	1.01±0.12	1.01±0.08	0.01±0.05	0.01±0.07
15	12	8.33	1.08±0.28	1.03±0.13	0.02±0.08	0.03±0.11
16	6	4.17	1.04±0.20	1.03±0.13	0.02±0.08	0.02±0.11
17	3	2.08	1.02±0.14	1.01±0.09	0.01±0.05	0.01±0.07
18	4	2.78	1.03±0.16	1.01±0.09	0.01±0.05	0.01±0.08
19	6	4.17	1.04±0.20	1.02±0.10	0.01±0.06	0.02±0.08
平均 Mean	13.16	7.00	1.09	1.06	0.03	0.05

19个剑豆种群的 AMOVA 结果(表 5)说明,剑豆种群内差异较小,只占总差异的 12%,种群间差异很大,占总差异的 88%。剑豆种群间的差异为主要差异,育种时应注重对种群的收集和选择,这与遗传多样性指数所显示结果相同。PCoA 结果(图 3)显示:前 3 个主坐标占有所有坐标的 82.73%,分别为 67.94%、9.12%和 5.97%。19 个种群的 190 个个体可分为 5 个类群,其结果与 UPGMA 方法所做的系统树的结果(图 4)基本相同:第 1 类群为 CHN1 的 10 个个体,来自于中国广东湛江,种子呈淡黄色或浅黄褐色,为晚熟、攀爬型;第 2 类群为种群

NT576、PI358592、BN-13474-63、PI470242、B1、B2、B3、CHN3 和 CHN4,原产于埃塞俄比亚、苏丹、印度尼西亚、巴西和中国,为早熟、直立或半直立型;第 3 类群包含种群 Tce 1、NT3073、NT3074、CPI50103、CPI58560 和 PI279593,原产于尼日利亚、哥伦比亚、委内瑞拉和菲律宾,为晚熟、攀爬型;第 4 类群为种群 210,来源于巴拉圭,种色为黄褐色或深褐色,为晚熟、攀爬型;第 5 类群包含种群 CHN2 和 PI487475,分别来源于中国广西和以色列,种色为红色,粒大,种脐长,为晚熟、攀爬型。

表 5 不同剑豆种群的分子方差分析

Table 5 Analysis of molecular variance (AMOVA) of 19 accessions of *C. ensiformis*

变异来源 Source	自由度 Degree of freedom	总方差 Sum of squares	均方差 Mean squares	方差分量 Variation component	百分比/% Percentage	Φ_{st}	P
种群间 Among accessions	18	3 542.658	196.814	19.420	88	0.882	0.001
种群内 Within accessions	171	446.400	2.611	2.611	12		
总计 Total	189	3 989.058		22.031	100		

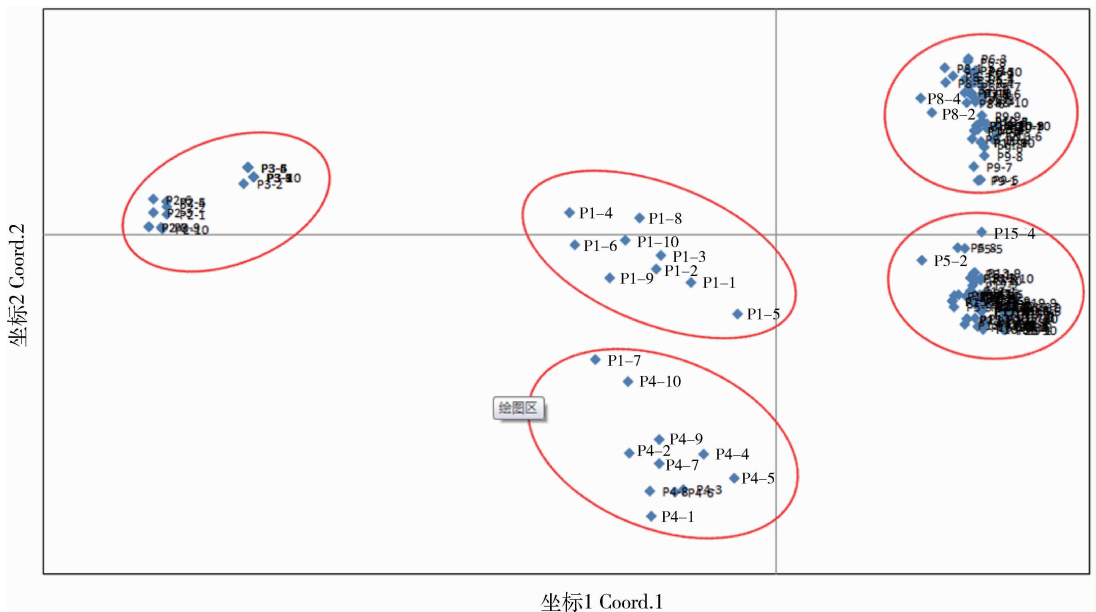


图 3 19 个剑豆种群的二维主坐标分析图

Fig. 3 Principal coordinates analysis (PCoA) of 19 accessions of *C. ensiformis*

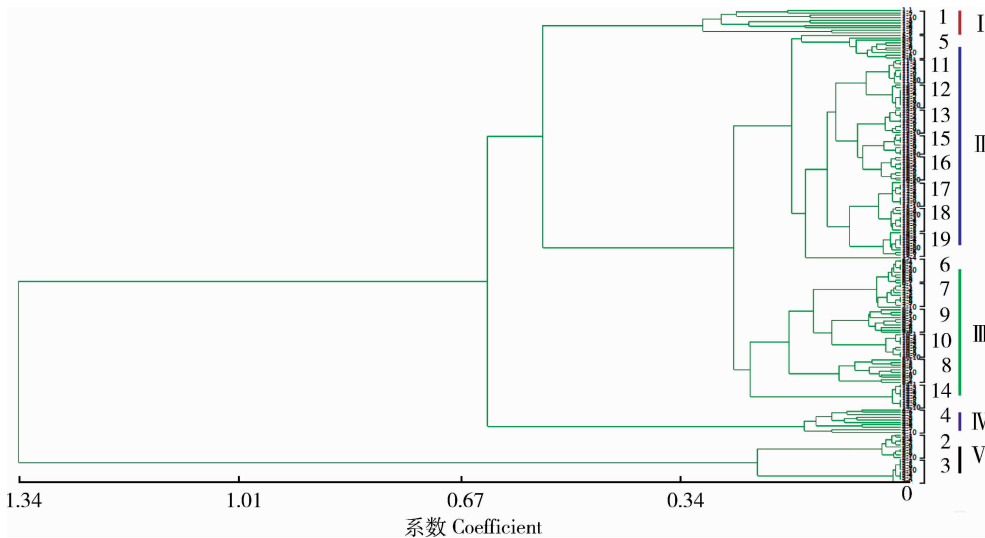


图 4 剑豆不同种群基于 Nei's 遗传距离的 UPGMA 聚类树状图

Fig. 4 UPGMA clustering dendrogram of *C. ensiformis* accessions based on Nei's genetic distance

3 讨论

剑豆作为一种未被开发的豆科植物,仅在少数地方被用作绿肥和覆草植物^[21]。剑豆种子中蛋白质、不饱和氨基酸和矿物质等含量丰富,是良好的食用、饲用植物。其种子中还含有很多类黄酮和多巴胺类物质,具有良好的保健效果。剑豆种子中刀豆蛋白 A 和脲酶的含量也较高,具有重要的化学和工业价值。

本研究采用 SRAP 分子标记来评估剑豆的遗传多样性,从 783 对引物中筛选出 28 对扩增产物较多且较清晰的引物对群体进行扩增。PIC 常用来衡量基因位点多态性高低的程度,可以评价 SRAP 引物在判定物种遗传多样性方面的作用,Vaiman 等^[22]和 Xie 等^[23]认为当 $PIC > 0.5$ 时,位点多态性高;当 $0.5 > PIC > 0.25$ 时,位点多态性中等;当 $PIC < 0.25$ 时,位点多态性低。本试验中 PIC 的范围在 0.16~0.43,平均值为 0.28,说明 SRAP 分子标记具有较好的判定剑豆不同种群多样性的能力,可用于不同种群的剑豆的分类和鉴定。引物对 Me27/Em28 和 Me21/Em23 的 PIC 值最高,分别为 0.43 和 0.41,说明其对剑豆各种群的分选效果较好。

本试验中剑豆总遗传多样性指数为 0.285 6,基因流为 0.065 6,说明剑豆不同种群间基因流动非常少。这与其繁育系统、地理分布和生活习性密切相关。剑豆座果率较低,每个花序上有 20~30 朵花,但最后结果的只有 2~4 朵,且主要的传粉媒介为蚂

蚁,部分种群间开花时间相差较大,这都限制不同种群间基因的交流。Smartt^[1]发现不同剑豆种群间杂交非常困难,这也侧面证实剑豆基因流动非常少。

PCoA 分析与 UPGMA 方法所做的系统树结果基本相同,19 个种群的 190 个个体可分为 5 个类群:第 1 类群为 CHN1 的 10 个个体,来自于中国广东湛江,种子呈淡黄色或浅黄褐色,为晚熟、攀爬型,可用作果实采集、荒坡水土保持、庭院遮荫等;第 2 类群为种群 NT576、PI358592、BN-13474-63、PI470242、B1、B2、B3、CHN3 和 CHN4,多属半直立型,有明显主干,但不善攀援,若不搭架很难攀爬,属于早熟型,适合与林木兼作;第 3 类群包含种群 Tee 1、NT3073、NT3074、CPI50103、CPI58560 和 PI279593,主干较硬,可以攀爬,分枝很多,生物量较大,属于晚熟型,适用于豆荚采食和林地覆盖、土壤改良、荒坡水土保持等,尤其是种群 NT3073 和 CPI 50103,结实很晚,生育周期很长,可在较长时间内起作用,种群 PI 279593 主干属于直立型,易于密植,分枝很多,枝叶浓密且落叶较晚,生物量相对较大,且植株整体易偏斜,覆草能力较强,极适用于土壤改良和林地覆盖;第 4 类群为种群 210,来源于巴拉圭,种色为黄褐色或深褐色,主干属于蔓生型,茎极细软,极善攀爬,无明显主干,叶细长,豆荚较短,较适用于庭院遮荫和豆荚的采收;第 5 类群包含种群 CHN2 和 PI487475,分别来源于中国广西和以色列,种色为红色,粒大,种脐长,此种群极善攀爬,生长快,分枝多,藤蔓能达十数米之长,生长迅速,结实

量大,可用作果实采集、荒坡水土保持、庭院遮荫等,但因节间距离较大,藤蔓太长,易于林木缠结,不适于林地覆盖。应根据用途和需要,选择利用不同的种群,或选择不同的种群做亲本,选育更适合的杂交后代。

本研究采用 SRAP 分子标记对剑豆不同种群进行分析,为剑豆遗传多样性、种质资源的评价和杂交亲本的选择提供了理论支持。

参 考 文 献

- [1] Smartt J. Evolution of grain legumes II Old and new world pulses of lesser economic importance[J]. *Exp Agr*, 1985, 21(1):1-18
- [2] 郑卓杰. 中国食用豆类学[M]. 北京:中国农业出版社,1997
- [3] Morris J B. Swordbean (*Canavalia ensiformis* (L) DC) genetic resources regenerated for potential medical, nutraceutical and agricultural traits[J]. *Genet Resour Crop Ev*, 2007, 54(3):585-592
- [4] Wortmann C S, McIntyre B D, Kaizzi C K. Annual soil improving legumes; Agronomic effectiveness, nutrient uptake, nitrogen fixation and water use[J]. *Field crop res*, 2000, 68(1):75-83
- [5] Quiroga-Madrigal R R. Effects of maize (*Zea mays* L) cropping systems and tropical legumes on soil chemical and biochemical properties and suppressiveness to soilborne plant pathogens[D]. Aunurn: Auburn University, 2000
- [6] Siddhuraju P, Becker K. Species/variety differences in biochemical composition and nutritional value of Indian tribal legumes of the genus *Canavalia*[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2001, 45(4):224-233
- [7] Sridhar K R, Seena S. Nutritional and antinutritional significance of four unconventional legumes of the genus *Canavalia*: A comparative study[J]. *Food Chem*, 2006, 99(2): 267-288
- [8] 王凌云. UV-B 辐射对矮生刀豆的生长及生理生化特性的影响[D]. 长沙:湖南农业大学, 2008
- [9] 李宁, 李铎, 冯志国, 等. 刀豆的化学成分[J]. *沈阳药科大学学报*, 2007, 24(11):676-678
- [10] 李时珍原著. 本草纲目:精华本[M]. 北京:科学出版社, 1998
- [11] Babar V S, Chavan J K, Kadam S S. Effect of heat treatments and germination on trypsin inhibitor activity and polyphenols in jackbean (*Canavalia ensiformis* L DC)[J]. *Plant Food Hum Nutr*, 1988, 38(4):319-324
- [12] Fagbenro O A, Adeparusi E O, Jimoh W A. Nutrient quality of detoxified jackbean (*Canavalia ensiformis* L DC) seeds cooked in distilled water or trona solution and evaluation of the meal as a substitute for soybean meal in practical diets for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, fingerlings[J]. *J Appl Entomol*, 2007, 12(3):289-300
- [13] Esonu B O, Udedibie A B I, Herbert U, et al. Comparative evaluation of raw and cooked jackbean (*canavalia ensiformis*) on the performance of weaner rabbits[J]. *World Rabbit Sci*, 1996, 3(4):139-141
- [14] 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(2/3):455-461
- [15] Agarwal M, Shrivastava N, Padh H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences[J]. *Plant Cell Rep*, 2008, 27(4):617-631
- [16] Jones N, Ougham H, Thomas H, et al. Markers and mapping revisited: Finding your gene[J]. *New Phytol*, 2009, 183(4): 935-966
- [17] 唐琴. 大花黄牡丹 SRAP 遗传多样性研究[D]. 雅安:四川农业大学, 2012
- [18] Yeh F C, Yang R, Boyle T. POPGENE VERSION 1. 31. Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis. Quick User Guide[EB/OL]. (1999-08) [2013-11-02]. <http://www.ualberta.ca/~fyeh/popgene.pdf>
- [19] Rohlf F J. NTSYSpc. Numerical Taxonomy and multivariate analysis system, version 2. 1[EB/OL]. (2000-05) [2013-11-02]. <http://www.exetersoftware.com/downloads/ntsystguide21.pdf>
- [20] Peakall R, Smouse P E. GenAlEx 6. 5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update[J]. *Bioinformatics*, 2012, 28(19):2537-2539
- [21] Pohlan H A, Janssens M J, Eversbusch B G. Impact of canavalia cover crop management in *Coffea arabica* L on plant-invertebrate associations[J]. *T Open Agr J*, 2008, 2(2): 84-89
- [22] Vaiman D, Mercier D, Moazami-Goudarzi K, et al. A set of 99 cattle microsatellite, characterization, synteny mapping and polymorphism[J]. *Mamm Genome*, 1994, 5(5):288-297
- [23] Xie W, Zhang X, Cai H, et al. Genetic diversity analysis and transferability of cereal EST-SSR markers to orchardgrass (*Dactylis glomerata* L)[J]. *Biochem Syst Ecol*, 2010, 38(4): 740-749

责任编辑:袁文业