

豇豆与饭豆种间杂种的获得及其鉴定

戴希刚, 郭 瑞, 潘 磊, 曾长立, 陈禅友*

(江汉大学生命科学学院, 湖北省豆类(蔬菜)植物工程技术研究中心, 武汉 430056)

摘 要: 对豇豆和饭豆进行种间杂交试验, 30 个正反交组合中有 3 个杂交组合获得种子, 它们分别是豇豆 A65×饭豆 B24、豇豆 A27×饭豆 D1、豇豆 A136×饭豆 A163。对获得的种间杂种及其双亲进行表型性状、生理指标及分子标记鉴定分析结果表明, 豇豆 A136×饭豆 A163 杂交组合所获杂种为假杂种, 其他 2 个杂交组合所获杂种为真杂种。利用豇豆与饭豆种间杂交将饭豆的有利性状基因导入豇豆中, 拓宽豇豆的遗传背景, 为豇豆种质资源的创新与新品种选育提供基础。

关键词: 豇豆; 饭豆; 种间杂交; 杂种鉴定; ISSR

中图分类号: S643.4

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X(2017)03-0519-06

Acquisition and identification of interspecific hybrids between cowpea and rice bean

DAI Xigang, GUO Rui, PAN Lei, ZENG Changli, CHEN Chanyou

(Hubei Province Engineering Research Center for Legume Plants School of Life Sciences, Jianghan University, Wuhan 430056)

Abstract: Interspecific hybridization between cowpea and rice bean was conducted. Three crosses, A65 × B24, A27 × D1, A136 × A163, among 30 reciprocal crosses produced seeds. Differences in phenotypic traits, physiological indicators and molecular markers between interspecific hybrids and their parents were studied. The results showed that A136 × A163 was false hybrids, while the other two were true hybrids. In this study, the favorable traits in rice bean were transferred to cowpea, which broadens the genetic background of cowpea and provides a basis for germplasm innovation and breeding of cowpea.

Key words: cowpea; rice beans; interspecific hybrids; hybrid identification; ISSR (Inter-simple sequence repeat)

豇豆为豆科蝶形花亚科豇豆属豇豆种, 学名为 *Vigna unguiculata* (L.) Walp., 豇豆属是豆科植物中的一个属, 包含有中国栽培的重要作物豇豆、绿豆、饭豆、小豆和黑吉豆等。在豇豆生产上, 病虫害的频发成为制约豇豆产量与品质的大问题, 利用农药杀除病虫害既易导致农药残留的食品安全问题, 又易使环境与生态受到污染和破坏, 要从根本上解决豇豆病虫害这一问题, 必须培育出抗病虫豇豆新品种。

我国豇豆育种, 仍是采用常规的传统育种方法, 一是从栽培群体中筛选优良的自然变异材料, 二是从不同品种间杂交的后代中选择性状优良的材料, 然后通过不断选育获得稳定的优良性状的后代植

株。这 2 种方法的致命弱点是原始材料的遗传多样性很低, 或者说基因库很小, 选择范围也就很小^[1]。要扩大豇豆基因库, 就得从豇豆栽培品种外寻找新的基因资源。这包括豇豆种的野生豇豆亚种和豇豆属的其他种。

饭豆 [*Vigna umbellata* (Thunb.) Ohwi & Ohashi] 属于豇豆属 *Ceratotropis* 亚属, 别名米豆、蔓豆、竹豆、精米豆和爬山豆等, 成熟的饭豆种子通常与米同煮为饭或粥, 饭豆也可作为重要的饲料和绿肥被利用^[2]。饭豆多种于热带和亚热带的低海拔地区, 具有丰富的遗传多样性, 能在炎热和潮湿的贫瘠土壤中生存, 并对病虫害有较强的抗性^[3]。数据表明, 饭豆具有一些有利的性状, 包括抗豆象^[4-5]、抗病,

收稿日期: 2016-11-17

基金项目: 武汉市科技计划项目(201250499145-13)资助。

作者简介: 戴希刚, 博士, 副教授。E-mail: xg_dai@163.com

* 通信作者: 陈禅友, 博士, 教授。E-mail: ccy@jhun.edu.cn

尤其是抗黄色花叶病毒^[6]和细菌性叶斑病^[7]和产量高^[8],然而在育种上对饭豆进行系统的研究的报道很少,因此,有学者形容饭豆是一个具有伟大潜力但被忽视的作物^[9]。

利用豇豆与饭豆种间杂交,能够将饭豆的有利性状基因导入豇豆中,创新豇豆种质资源,并进一步选育出豇豆新品种。通过远缘杂交可以安全、有效地实现豇豆和饭豆间优异基因的交流,不会像转基因方法导致食品安全问题和生态影响。目前,国内外在利用远缘杂交进行豇豆种质创新方面的报道较少,仅见豇豆与野豇豆的远缘杂交报道^[10-11],而豇豆与饭豆的远缘杂交的研究尚属空白。本研究用豇豆与饭豆进行种间有性杂交,对获得的种间杂种园艺学性状与分子特性进行鉴定,以期将饭豆的抗性基因转移至豇豆中,从而拓宽豇豆的遗传背景,改进豇豆栽培品种的抗性,为豇豆种质资源的利用与新材料的创制提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究杂交试验所用豇豆与饭豆种质材料均由湖北省豆类(蔬菜)工程技术研究中心提供。

1.2 方法

1.2.1 种间杂交方法 杂交试验在湖北省豆类(蔬菜)工程技术研究中心试验基地进行,共进行了20个豇豆和饭豆杂交组合的正反交试验(各杂交组合父母本见表1)。在盛花期对母本的300余个花蕾进行蕾期隔离去雄,采集当日开放的已做隔离的父本的新鲜花粉直接给母本授粉,并对套袋授粉的花枝挂标记牌,标记牌上标明父母本及其株号授粉花数,授粉日期。杂交后的1周内应注意检查,确定套袋严密,无脱落破损,以保证杂交结果准确可靠。雄蕊的有效期过去后,应及时摘袋,及时摘除没有杂交的花果,保证杂交果实发育良好,授粉后50d左右收获荚果,剥取种子。

1.2.2 表型现状观察 2013年5月和8月将成功获得杂种后代的亲本、F₁及F₂种植于湖北省豆类(蔬菜)工程技术研究中心试验基地,随机选取各3株进行表型性状观察鉴定,包括叶长、叶宽、荚长、荚宽、荚厚、单荚鲜重、种子密度、种子百粒重、种子长、种子宽、种子厚和种子形态等指标,采用Excel软件进行平均值及标准偏差计算。

1.2.3 生理指标鉴定 对3个杂交组合的F₁及双亲的荚果测定其粗纤维含量、可溶性蛋白质含量和可溶性糖含量,具体方法参照陈禅友等^[12]的方法。

1.2.4 ISSR 分析 用改良CTAB法^[13]提取亲本、F₁的基因组DNA。根据British Columbia大学公布的ISSR引物序列,由上海生工生物工程技术有限公司合成20条引物(引物信息见表2),从中筛选出扩增条带清晰和多态性好的引物用于后续分析。PCR扩增反应体系为10 μL,包含1×PCR缓冲液,2 mmol·L⁻¹MgCl₂,0.1 mmol·L⁻¹dNTPs,0.4 μmol·L⁻¹的引物,20 ng DNA和0.5 U TaqDNA聚合酶。反应程序为95℃预变性3 min;94℃变性30 s,退火30 s,72℃延伸45 s,循环35次;72℃延伸7 min。扩增产物在90 V电压下2.0%琼脂糖凝胶(TAE电泳缓冲液,0.5 μg·L⁻¹EB)上电泳检测。在凝胶成像系统(KODAK)上观察、照相。DNA片断的分子量大小根据DL2000 DNA Marker电泳迁移距离确定。

表 1 20 个豇豆和饭豆正反交组合的父母本与母本

Table 1 The male and female parent of 30 reciprocal crosses between cowpea and rice bean

杂交组合编号 Number of hybrid combination	母本 Male parent	父本 Female parent
1	豇豆 A136	饭豆 A97
2	饭豆 A97	豇豆 A136
3	豇豆 A27	饭豆 A63
4	饭豆 A63	豇豆 A27
5	豇豆 A27	饭豆 D1
6	饭豆 D1	豇豆 A27
7	豇豆 A32	饭豆 A128
8	饭豆 A128	豇豆 A32
9	豇豆 B35	饭豆 A63
10	饭豆 A63	豇豆 B35
11	豇豆 B35	饭豆 A111
12	饭豆 A111	豇豆 B35
13	豇豆 A65	饭豆 B24
14	饭豆 B24	豇豆 A65
15	豇豆 A82	饭豆 A116
16	饭豆 A116	豇豆 A82
17	豇豆 A136	饭豆 A163
18	饭豆 A163	豇豆 A136
19	豇豆 A65	饭豆 A97
20	饭豆 A97	豇豆 A65

2 结果与分析

2.1 种间杂交结果

在豇豆和饭豆的20个杂交组合中,有3个杂交组合获得种子,它们分别是5号、13号和17号杂交组合,即豇豆A65×饭豆B24、豇豆A27×饭豆

D1、豇豆 A136×饭豆 A163。3 个杂交组合结实情况见表 3。

2.2 种间杂种育性表现

3 个杂交组合的种间杂种 F₁ 种子部分种胚发育不良, 表现为种子不饱满, 种子明显小于母本种子, 且发芽率较低 (表 3)。杂种 F₁ 植株生长正常, 花

粉有育性, 能正常结实, 其自交所产种子 F₂ 发芽率较高, 与常规种子无差异。

2.3 种间杂种 F₁ 表型性状观察鉴定

田间观察发现, 种间杂种 F₁ 生长势较强, F₁ 表型性状与双亲有较大差异, 且多介于双亲之间, 具体见图 1 和图 2。

表 2 ISSR 分析所用引物序列

Table 2 Sequence of primers used for ISSR analysis

引物编号 Number of primer	碱基序列 Sequence (5'—3')	引物编号 Number of primer	碱基序列 Sequence (5'—3')
808	(AG) ₈ C	843	(CT) ₈ RA
809	(AG) ₈ G	844	(CT) ₈ RC
810	(GA) ₈ T	849	(GT) ₈ YA
811	(GA) ₈ C	855	(AC) ₈ YT
822	(TC) ₈ A	856	(AC) ₈ YA
823	(AG) ₈ YT	857	(AC) ₈ YG
834	(AG) ₈ YC	888	BDB(CA) ₇
835	(GA) ₈ YC	889	DBD(AC) ₇
841	(GA) ₈ YC	890	VHV(GT) ₇
842	(GA) ₈ YG	891	HVH(TG) ₇

注: Y = C 或 T, R = A 或 G, B = 无 A, D = 无 C, H = 无 G, V = 无 T。

Note: Y = C or T, R = A or G, B = without A, D = without C, H = without G, V = without T.

表 3 3 个杂交组合的结实情况及其 F₁、F₂ 发芽率

Table 3 Seed setting of 3 hybrid combinations and germination rates of their F₁ and F₂

杂交组合 Hybrid combinations	授粉花朵数/个 Number of pollination	结荚数/个 Pod number	种子数/个 Seed number	F ₁ 发芽率/% Germination of F ₁	F ₂ 发芽率/% Germination of F ₂
A65×B24	15	1	6	50.0	92.6
A27×D1	12	2	11	36.4	95.1
A136×A163	14	1	13	69.2	93.8

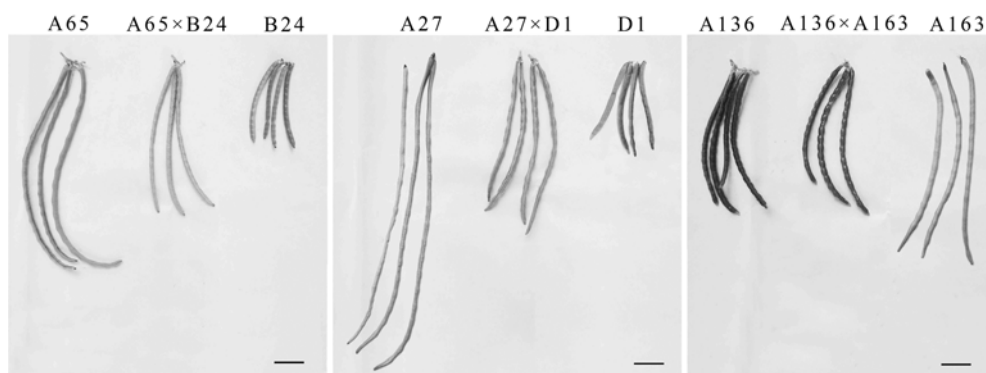


图 1 A65×B24、A27×D1、A136×A163 3 个杂交组合亲本与 F₁ 的豆荚形态 (左边为母本, 中间为 F₁, 右边为父本, Bar = 5 cm)
Figure 1 Pods morphology of F₁ and their parents from three crosses as A65 × B24, A27 × D1 and A136 × A163 (the female parent was on the left, F₁ was in the middle, and the male parent was on the right, Bar = 5 cm)

通过对杂种 F₁ 和亲本的叶长、叶宽、荚长、荚宽、荚厚、单荚鲜重、种子密度、种子百粒重、种子长、种子宽和种子厚等表型性状的测量比较 (表 4), 据表型性状的测量值可将 F₁ 表型性状分为 4 类:

偏母型、偏父型、中间型和超亲型。性状观察发现, 豇豆 A136×饭豆 A163 杂交组合中, F₁ 与母本各形态指标大致相似, 初步判断其为假杂种。

对于杂交组合 A65×B24, 从其双亲及杂种的

叶长、种子百粒重来看，杂种表现为超亲型，而从叶宽、荚长、荚宽、单荚鲜重、种子密度、种子长、种子宽和种子厚来看，杂种的数值在双亲之间，表现为中间型。

对于杂交组合 A27×D1，从其双亲及杂种的叶长、荚厚来看，杂种表现为偏父型；从叶宽、种子长来看，杂种又表现为偏母型；从荚长、荚宽、单荚鲜重和种子密度看，杂种表现为中间型；而种子

百粒重、种子宽和种子厚方面，杂种表现出了超亲优势。

对于杂交组合 A136×A163，从其双亲及杂种的叶长、叶宽、荚厚、种子百粒重和种子厚来看，杂种表现为中间型；从荚长、荚宽、单荚鲜重、种子密度、种子长和种子宽等来看，杂种又表现为偏母型。

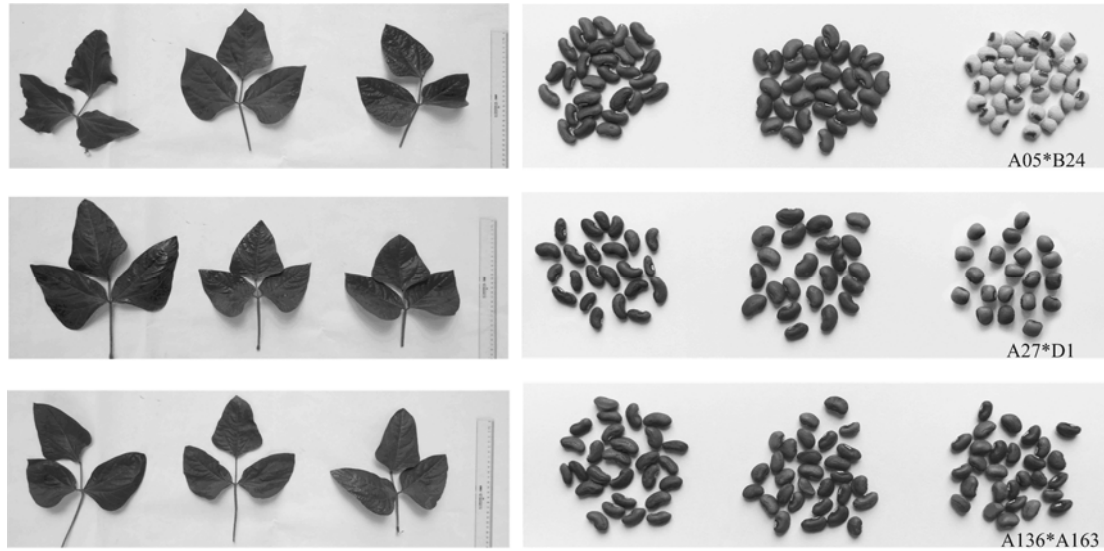


图 2 A65×B24、A27×D1、A136×A163 3 个杂交组合亲本与 F₁ 的叶片与种子形态 (左边为母本, 中间为 F₁, 右边为父本)
Figure 2 The leaf and seed morphology of F₁ and their parents for three crosses as A65×B24, A27×D1 and A136×A163 (the female parent was on the left, F₁ was in the middle, and the male parent was on the right)

表 4 3 个杂交组合 F₁ 与亲本表型性状测定结果
Table 4 Phenotypic traits of F₁ and their parents for three crosses

表型性状 Phenotypic trait	A65	A65×B24	B24	A27	A27×D1	D1	A136	A136×A163	A163
叶长/cm Leaf length	19.63±1.51	21.48±2.36	18.05±0.58	22.55±1.59	18.83±1.13	17.53±0.94	18.33±1.02	17.45±0.93	17.25±0.90
叶宽/cm Leaf width	11.13±1.77	10.13±0.62	9.78±0.51	10.50±1.07	10.43±0.71	9.48±0.50	9.53±0.86	9.25±1.35	8.63±0.60
荚长/cm Pod length	48.33±2.59	25.00±1.74	14.45±0.62	54.65±3.84	27.25±2.25	17.70±0.67	26.85±0.54	26.30±2.56	35.65±2.19
荚宽/cm Pod width	0.99±0.05	0.85±0.04	0.84±0.01	1.15±0.04	1.00±0.06	0.92±0.03	0.93±0.11	0.94±0.05	0.79±0.04
荚厚/cm Pod thickness	0.76±0.04	0.53±0.09	0.59±0.06	0.78±0.05	0.68±0.06	0.65±0.05	0.71±0.06	0.67±0.06	0.64±0.02
单荚鲜重/g Fresh weight per pod	18.44±3.40	7.67±1.76	4.87±0.28	20.59±1.38	12.01±1.73	8.02±0.28	10.02±2.40	11.68±2.71	17.69±1.63
种子密度/粒·cm ⁻¹ Seed density	0.37±0.03	0.68±0.05	0.97±0.04	0.20±0.05	0.48±0.03	0.71±0.06	0.60±0.04	0.60±0.03	0.22±0.02
种子百粒重/g 100-seed weight	11.05±0.42	11.75±0.86	11.19±0.35	15.52±1.08	21.74±1.66	11.52±0.64	15.23±0.92	14.29±0.88	14.16±1.05
种子长/cm Seed length	1.05±0.05	0.88±0.06	0.71±0.02	1.18±0.12	1.15±0.02	0.35±0.01	1.02±0.03	0.99±0.07	1.06±0.06
种子宽/cm Seed width	0.51±0.01	0.53±0.02	0.57±0.01	0.54±0.01	0.70±0.05	0.29±0.01	0.63±0.01	0.65±0.02	0.57±0.09
种子厚/cm Seed thickness	0.35±0.04	0.42±0.01	0.47±0.01	0.49±0.02	0.53±0.02	0.25±0.01	0.50±0.02	0.49±0.01	0.48±0.07

2.4 种间杂种 F₁ 生理指标鉴定

对其中 2 个杂交组合 A65×B24, A27×D1 的

F₁ 及双亲荚果的生理指标进行测定, 测定指标有粗纤维含量、可溶性蛋白质含量和可溶性糖含量具体

结果见图 3。

杂交组合 A27×D1, 其母本粗纤维含量 8.50%, 种间杂种粗纤维含量 10.50%, 父本粗纤维含量 12.22%。种间杂种粗纤维含量数值在母本和父本之

间, 表现为中间型。杂交组合 A65×B24, 其母本粗纤维含量 10.14%, 种间杂种粗纤维含量 11.02%, 父本粗纤维含量 8.08%, 种间杂种粗纤维含量数值比母本和父本都要大, 表现为超亲型。

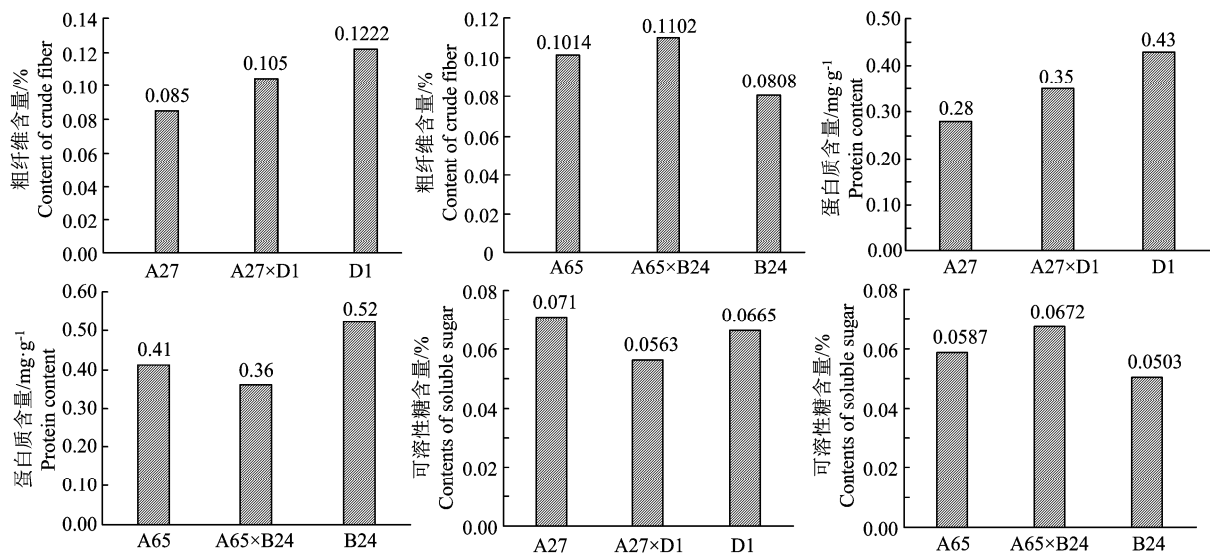
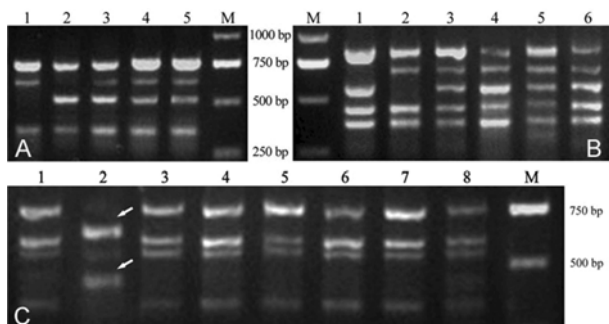


图 3 A65×B24、A27×D1 两个杂交组合 F₁ 及父母本的粗纤维、蛋白质及可溶性糖含量

Figure 3 Contents of crude fiber, protein and soluble sugar in F₁ and their parents of two crosses as A65 × B24 and A27 × D1



A: 1、2 为 A65 和 B24, 3~5 为二者 F₁; B: 1、2 为 A27 和 D1, 3~6 为二者 F₁; C: 1、2 为 A136 和 A163, 3~8 为二者 F₁, 箭头所指为父本特异条带; M 为 DNA Marker

A: 1 and 2 were A65 and B24, 3-5 were their F₁; B: 1 and 2 were A27 and D1, 3-6 were their F₁; C: 1 and 2 were A136 and A163, 3-8 were their F₁. The arrows indicated the specific bands of male parents; M was DNA Marker

图 4 引物 834 在 3 个杂交组合亲本及 F₁ 中的扩增效果
Figure 4 The amplified results of F₁ and their parents of three crosses by primer 834

杂交组合 A27×D1, 其母本可溶性蛋白质含量 0.28 mg·g⁻¹, 种间杂种含量 0.35 mg·g⁻¹, 父本含量 0.43 mg·g⁻¹, 种间杂种可溶性蛋白质含量数值在母本和父本之间, 表现为中间型。杂交组合 A65×B24, 其母本可溶性蛋白质含量 0.41 mg·g⁻¹, 种间杂种含量 0.36 mg·g⁻¹, 父本含量 0.52 mg·g⁻¹, 种间杂种可

溶性蛋白质含量数值低于母本和父本, 不具有杂种优势。

杂交组合 A27×D1, 其母本可溶性糖含量 7.10%, 种间杂种含量 5.63%, 父本含量 6.65%, 种间杂种可溶性糖含量数值低于母本和父本, 不具有杂种优势。杂交组合 A65×B24, 其母本可溶性糖含量 5.87%, 种间杂种含量 6.65%, 父本含量 5.03%, 种间杂种可溶性糖含量数值高于母本和父本, 表现为超亲型。

2.5 种间杂种 F₁ 的 ISSR 分子标记鉴定

采用 20 条 ISSR 引物对 3 个杂交组合获得的 13 株 F₁ 植株进行杂种真假鉴定, 结果表明 (图 4), 豇豆 A65×饭豆 B24 的 3 株 F₁ 单株均带有双亲的特异条带, 豇豆 A27×饭豆 D1 的 4 株 F₁ 单株均带有双亲的特异条带, 这表明这两个杂交组合的 F₁ 单株都是真杂种。而豇豆 A136×饭豆 A163 的 64 株 F₁ 单株条带均与母本一样, 没有扩增出父本的特异性条带, 这说明该杂交组合所得的 F₁ 是假杂种。

3 讨论

通过豇豆和饭豆的远缘杂交研究, 对 3 个杂交组合的亲本及所得杂交种子的表型性状: 叶长、叶宽、荚长、荚宽、荚厚、单荚鲜重、种子密度、种

子百粒重、种子长、种子宽和种子厚比较分析, 可得出 F_1 生长势较强, F_1 表型性状与双亲有较大差异, 且多介于双亲之间具有超亲优势和中间优势。对杂交组合豇豆 A136×饭豆 A163 进行分析发现, F_1 的表型性状各数值和母本差别很小, 个别表型性状数值和母本相同, 经 ISSR 分子标记鉴定, 进一步验证了该结论。因此可判断, 杂交组合豇豆 A136×饭豆 A163 杂交试验失败, 其 F_1 代应为母本 A136 自花授粉所得。通过对两个杂交组合豇豆 A27×饭豆 D1、豇豆 A65×饭豆 B24 父母本与杂种的各项生理指标的测定, 发现杂种的生理指标为超亲型和中间型, 因此, 可根据所需的育种目标来选择杂交亲本。赵海明等^[14]对高粱与苏丹草的种间杂种的生物学性状遗传分析上也得出相似结论。本研究采用亲本材料及授粉花朵数量有限, 若加大样本数量, 豇豆与饭豆的种间杂交成功率将会更高。

参考文献:

- [1] 何礼. 我国栽培豇豆的遗传多样性研究及其育种策略的探讨[D]. 成都:四川大学, 2002.
- [2] TOMOOKA N, VAUGHAN D A, MOSS H, et al. The Asian *Vigna*: genus *Vigna* subgenus *Ceratotropis* genetic resources [M]. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2002.
- [3] SAIKIA P, SARKAR C R, BORUA I. Chemical composition, antinutritional factors and effect of cooking on nutritional quality of rice bean [*Vigna umbellata* (Thunb; Ohwi and Ohashi)] [J]. Food Chem, 1999, 67: 347-352.
- [4] KASHIWABA K, TOMOOKA N, KAGA A, et al. Characterization of resistance to three bruchid species (*Callosobruchus* spp., Coleoptera, Bruchidae) in cultivated rice bean (*Vigna umbellata*) [J]. J Econ Entomol, 2003, 96: 207-213.
- [5] SOMTA P, KAGA A, TOMOOKA N, et al. Development of an interspecific *Vigna* linkage map between *Vigna umbellata* (Thunb.) Ohwi & Ohashi and *V. nakashimae* (Ohwi) Ohwi & Ohashi and its use in analysis of bruchid resistance and comparative genomics [J]. Plant Breeding, 2006, 125: 77-84.
- [6] BORAH H K, DEBCHOUDHURY P K, SHEIKH I A, et al. Genetic parameters correlations and path analysis among yield and yield characters in ricebean (*Vigna umbellata* (Thunb.) Ohwi and Ohashi) [J]. Madras AGR J, 2001, 88: 629-632.
- [7] ARORA R K, CHANDEL P S, JOSHI B S, et al. Rice bean: tribal pulse of Eastern India [J]. Econ Bot, 1980, 34: 260-263.
- [8] SMARTT J. Evolution and genetic resources [M]//Smartt J Grain legumes. Cambridge: Cambridge University Press, 1990.
- [9] ISEMURA T, KAGA A, TOMOOKA N, et al. The genetics of domestication of rice bean, *Vigna umbellata* [J]. Ann Bot-London, 2010, 106: 927-944.
- [10] BARONE A, GIUDICE A, NG N Q. Barriers to interspecific hybridization between *Vigna unguiculata* and *Vigna vexillata* [J]. Sex Plant Reprod, 1992, 5(3): 195-200.
- [11] GOMATHINAYAGAM P, GANESH R S, RATHNASWAMY R, et al. Interspecific hybridization between *Vigna unguiculata* (L.) Walp. and *V. vexillata* (L.) A. Rich. through *in vitro* embryo culture [J]. Euphytica, 1998, 102(2): 203-209.
- [12] 陈禅友, 胡金萍, 刘伟, 等. 豇豆品种品质性状及其遗传参数分析[J]. 江汉大学学报(自然科学版), 2007,35(3): 64-68.
- [13] MURRY H G, THOMPSON W F. Rapid isolation of higher weight DNA [J]. Nucleic Acid Res, 1980, 8: 4321.
- [14] 赵海明, 李源, 谢楠, 等. 高粱与苏丹草远缘杂交 F_1 的生物学性状遗传分析[J]. 云南农业大学学报, 2011, 26(1): 6-11.