

苦瓜品种资源聚类分析

刘政国,熊 俏,龙明华,王先裕
(广西大学农学院,南宁 530005)

摘要:对14个不同绿苦瓜、白苦瓜和广西野生苦瓜品种的种子可溶性蛋白、盐溶性蛋白、醇溶性蛋白和碱溶性蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,运用遗传距离系数对14个苦瓜品种进行聚类分析方法;同时利用8个数量性状计算主成分遗传距离,对14个苦瓜品种进行聚类分析。结果表明,广西野生苦瓜与其他13个栽培品种之间遗传距离系数大,数量遗传距离也大,亲缘关系远,分别归为不同的品种类群;栽培品种间差异小,很难进行类群的清晰划分。

关键词:苦瓜;蛋白质;遗传距离;聚类分析

中图分类号:S642.5 **文献标识码:**A

Cluster Anysis of Variety Resources in Bitter Gourd

Liu Zhengguo, Xiong Qiao, Long Minghua, Wang Xianyu
(Agricultural College, Guangxi University, Nanning 530005)

Abstract: Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) of seed water-soluble protein, salt-soluble protein, alcohol-soluble protein and alkali-soluble protein was carried out by using 14 green, white and Guangxi wild cultivars in this experiment. At the same time, quantitative genetic distances were calculated by using 8 quantitative characters. Cluster anysis of 14 cultivars were conducted according to genetic distances. The results showed that Guangxi wild bitter gourd was significantly different from other 13 cultivated cultivars in the protein fingerprints and quantitative genetic distances. However, the protein fingerprints showed a little difference among other 13 cultivars. All cultivars could not be clearly classified for the little difference.

Key words: bitter gourd, protein, genetic distance, cluster anysis

苦瓜原产于热带亚洲,起源于印度—缅甸中心,广泛分布亚热带、热带及温带地区。苦瓜还是一种药菜两用植物,药食兼用,世界上很多发展中国家将苦瓜作为传统药物使用。在印度,以苦瓜为原料的制药技术被申请了一系列的专利。在土耳其的民间药方里,成熟的苦瓜果实用于伤口的快速治愈和治消化性溃疡^[1]。尽管苦瓜遗传育种研究方面取得了一系列进展,但苦瓜品种资源和品种间亲缘关系的研究还不深入。人们习惯上将苦瓜按果实颜色不同分为白苦瓜和绿苦瓜,或按果实形状不同而分为长圆棒形、纺锤形和短圆棒形。胡开林等根据形态特征将24个长身类苦瓜分为5个品种群^[2]。张长远等利用RAPD分子标记将45个栽培苦瓜品种分成滑身类和麻点类两大类^[3]。但

目前国内外还没见有对野生苦瓜和栽培苦瓜的亲缘关系进行研究的有关报道。

植物种子蛋白质电泳分析已广泛用于植物学分类^[4-5]、遗传多样性^[6-7]和品种鉴定^[8]等方面的研究。但从种子蛋白质谱带差异研究苦瓜品种资源尚未见报道。因此此试验以不同绿苦瓜、白苦瓜品种广西野生苦瓜的种子作为材料,对其可溶性蛋白、盐溶性蛋白、醇溶性蛋白和碱溶性蛋白进行种子蛋白质聚丙烯酰胺凝胶电泳分析,同时进行数量性状的遗传距离分析,应用聚类分析方法初步确定不同苦瓜品种之间的亲缘关系,为广西野生苦瓜的植物学分类和栽培苦瓜品种类群的划分提供依据。

第一作者简介:刘政国,男,1965年出生;从事蔬菜学研究,在国内刊物发表论文10多篇。通信地址:530005 广西大学东校园 8029#, E-mail: liu-zhengguo@126.com。

收稿日期:2008-11-27, **修回日期:**2009-01-19。

1 材料与方法

1.1 材料

选择供试的14个品种的种子作为材料(表1),14个品种均经过5代以上自交纯化。

表1 供试苦瓜品种

品种编号	品种名称	果皮颜色和瘤状	产地
1	泰国高优好二号分离后代	白,麻点	泰国
2	福建白苦瓜	白,麻点	福建
3	蓝山大白苦瓜	白,麻点	湖南
4	新化白苦瓜	白,麻点	湖南
5	四川什邡白苦瓜	白,麻点	四川
6	云霄苦瓜	白,麻点	福建
7	刺王白苦瓜	白(有刺),麻点	云南
8	广西野生苦瓜	绿白,麻点	广西
9	苏圩苦瓜	绿,滑身	广西
10	碧翠苦瓜后代	绿,滑身	广东
11	南宁郊区绿苦瓜	绿,滑身	广西
12	泰国蔓苦青皮苦瓜	绿,滑身	泰国
13	碧绿苦瓜后代	绿,滑身	广东
14	巨丰苦瓜后代	绿,滑身	广东

1.2 种子蛋白质电泳分析

每份材料取1粒苦瓜种子,剥除种皮后用研钵磨碎,分别用不同的提取液提取不同的种子贮藏蛋白。每份材料应重复5次。

水溶性蛋白:用pH 8.9 Tris-HCl缓冲液提取,移到2 ml微型离心管,以10 000 r/min离心7 min,取上清液进行分析。采用聚丙烯酰胺凝胶双垂直平板不连续正极电泳。浓缩胶缓冲液为pH 6.8 Tris-HCl,浓缩胶浓度为3.1%。分离胶缓冲液为pH 8.9 Tris-HCl,分离胶浓度为7.18%。电极缓冲液为pH 8.3、0.049 M Tris-甘氨酸。点样20 μ l,稳压500V电泳。0.01%溴酚蓝指前沿,用考马斯亮兰R-250染色^[9]。

醇溶性蛋白:用0.05%甲基氯+25%2-氯乙醇提取,按颜启传的方法电泳和染色^[10]。

盐溶性蛋白:用0.04%甲基氯+0.6% NaCl提取,按颜启传的方法电泳和染色^[10]。

碱溶性蛋白:用0.2% NaOH+0.05%甲基氯提取,按孙雁等的方法电泳和染色^[11]。

遗传距离系数的分析采用“0-1”系统记录谱带位置,确定带的有无,并逐一转化成二项数据,有带为1,无带为0。按Nei的方法计算品种间相似系数(GS),遗传差异(GD)=1-GS,利用GD值按类平均法进行聚类分析。统计分析在DPS软件系统下进行^[2]。

1.3 田间试验设计

试验在2006年春季进行。14份试验材料的苦瓜种子,经浸种催芽后于2月8日播于营养杯育苗,3月2日定植大田。畦宽1.5 m(连沟),每畦种植两行,株距0.50 m。3次重复,随机区组设计,每个小区20株。四周设保护行,田间栽培管理同一般大田生产。

1.4 数据收集

对14份材料共观测8个数量性状。第一雌花节位记载全小区的20个单株;叶长在生长盛期每株取第19、20、21片叶测值;节间长在生长盛期测19~21节的长度;茎粗于生长盛期测19、20和21节中间位置粗度。叶长、节间长和茎粗测全小区的20个单株。以上3个性状测完后均计算小区平均值。

从每个小区中采收20个较老熟的果实留种,测种子千粒重和种子厚,种子厚每个小区随机取50粒种子测定。

播种——始花天数为每小区播种到有一半植株开放第一朵雌花的天数。

冷害指数:3月两次较强冷空气袭击后,在大田调查每个小区冷害情况。按冷害程度不同分为5级:0级:完全无冷害;1级:植株基部有1~2片叶受冷害影响局部褪绿;2级:植株基部有1~2片叶受冷害影响完全褪绿,往上有2~3片叶局部褪绿;3级:植株基部有3~4片叶受冷害影响完全褪绿,往上有3~4片叶局部褪绿;4级:植株有5片以上叶受冷害影响完全褪绿,基部有1~2片叶受冷害影响腐烂。

1.5 统计分析方法

全部性状以小区平均值为单位进行统计分析。8个性状经方差分析,品种间差异均达1%显著水平。

对以上8个性状进行两两之间的协方差分析,计算出所有性状之间的遗传相关系数,构成遗传相关系数矩阵R。用Jacobi旋转相似变换求解矩阵R的特征根 λ 和相应的特征向量。按刘来福提出的公式 $D_{ij}^2 = \sum (g_{ik} - g_{jk})^2$ 计算主成分遗传距离^[12],主成分累计贡献率取70%~85%^[13]。利用遗传距离按类平均法进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 蛋白质遗传距离系数的聚类分析

每个样品在可溶性蛋白、盐溶性蛋白、醇溶性蛋白和碱溶性蛋白这4种蛋白质分别电泳出9条,8条,11条和14条带,电泳条带按有或无记录,有赋值为1,无赋值为0,计算出品种间遗传距离系数。对14个品种之间的遗传距离系数矩阵进行聚类分析得到图1所示聚类图。

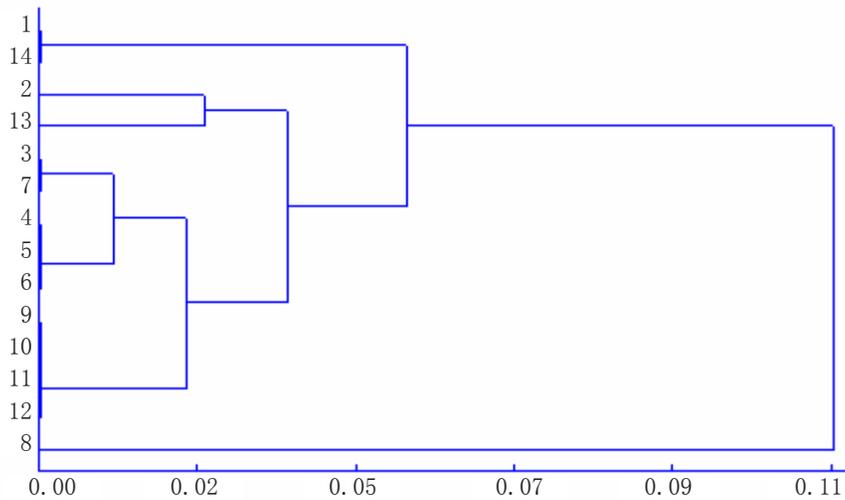


图1 14个苦瓜品种4种蛋白聚类图

由图1可以看出,1与14之间,3与7之间,4、5、6之间,9、10、11、12之间,这4个品种组合内部各品种之间距离系数为0.00,各聚为一类;8与其它13个品种距离系数为0.11,距离远,说明它们遗传差异大,分为不同类。

由此可见,4种蛋白质PAGE鉴定方法一起,初步确定了8(广西野生苦瓜)与栽培品种(1~7、9~14)之间遗传距离系数最大,1、14这2个品种与其它11个品种之间遗传距离系数次之,其它品种之间距离系数很小。遗传距离系数应该反映了它们之间的品种亲缘关系远近。

2.2 数量性状遗传距离的聚类分析

利用8个数量性状计算出主成分遗传距离,对14个品种之间的遗传距离矩阵进行聚类分析得到图2所示聚类图。

从图2可看出,在遗传距离为24.32时,8(广西野生苦瓜)与其它13个品种被归为两大类,这一点与蛋白质遗传距离系数聚类分析的结果完全一致。栽培苦瓜品种群在遗传距离为4.86时又进一步归为两类,1,5,7,9,11,12,14为一类,包括3个白苦瓜和4个绿苦瓜;2,3,4,6,10,13为另一类,包括4个白苦瓜和2个绿苦瓜,与蛋白质遗传距离系数聚类分析的结果有偏差。

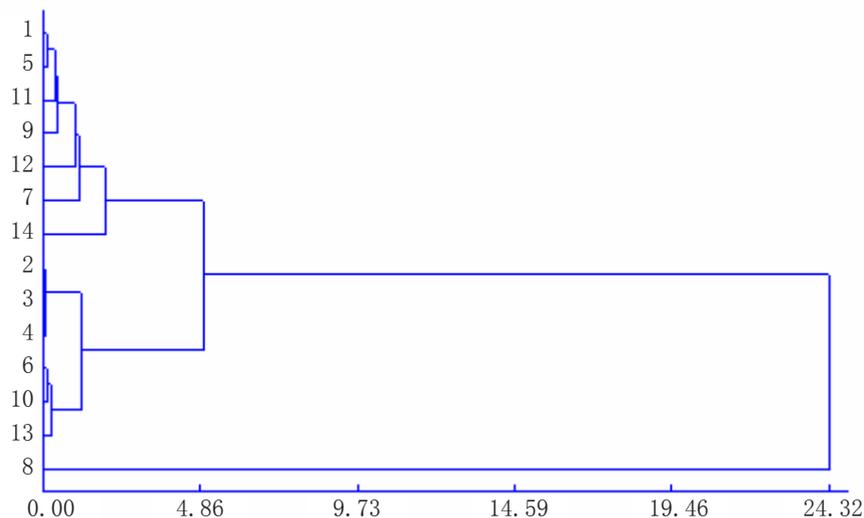


图2 14个苦瓜品种数量性状遗传距离聚类图

广西野生苦瓜遍布广西南宁市、柳州市、百色市和河池市等地的广大山区,多年来在山上自生自长,适应能力很强。该品种表现出叶子小、果实小、结果多,从植株外部形态上看明显不同于各种栽培苦瓜品种。用

广西野生苦瓜同各种栽培的绿苦瓜、白苦瓜和刺苦瓜进行了广泛的杂交,结果都是100%的亲,杂种生长旺盛,表现出较强的杂种优势。因此可以确定广西野生苦瓜和栽培苦瓜应该是植物学上的同一个种,从两

种聚类分析的结果看,是否可以将广西野生苦瓜列为不同的亚种,还需进一步研究。

尽管苦瓜生产上有白苦瓜和绿苦瓜之分,但两种聚类分析的结果不能支持这一习惯分类方法。实际上白苦瓜和绿苦瓜只是一个性状上的差异,而且这一果实颜色性状有人指出由单基因控制^[14],如果以这样小的性状差异做为品种大类的划分显然是不合适的。

3 讨论与小结

(1)苦瓜属中的苦瓜种应该包含有各种栽培和野生的苦瓜品种。尽管国内学者对苦瓜种质资源进行了一些研究,但使用的都是栽培品种,还没有学者使用过野生品种。该试验在苦瓜品种资源研究中使用了广西野生苦瓜,4种蛋白PAGE鉴定和数量性状遗传距离测定均可以较好地地区和鉴定广西野生苦瓜品种与栽培品种,这两个品种类群差异大,亲缘关系较远。再结合外部形态上的差异,认为广西野生苦瓜和栽培苦瓜应该分属不同的类型。

(2)栽培苦瓜品种中类群的划分,国内学者已进行过一些研究。胡开林等根据形态特征将24个长身类苦瓜分为不同熟性的5个品种群^[3]。张长远等利用RAPD分子标记将45个栽培苦瓜品种分成滑身类和麻点类两大类,滑身类又分为来源于国内和来源于东南亚的两组^[3]。但温庆放等同样利用RAPD分子标记将24个栽培苦瓜品种分成三大类群,但RAPD的聚类分析与形态特征的表现不一致^[15]。试验中13个栽培品种之间尽管部分蛋白质谱带有较小差异,但很难进行类群的清晰划分,白(麻点)苦瓜品种类群与绿(滑身)苦瓜品种类群间并没有明显的谱带差异,数量性状遗传距离聚类分析也不能区分白苦瓜和绿苦瓜。因此,栽培苦瓜品种中类群的划分还有待于寻找更加丰富的多态性遗传标记,并结合植物学性状,进行更深入的研究。

参考文献

- [1] J.K. Grover, S.P. Yadav. Pharmacological actions and potential uses of *Momordica charantia*: a review[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2004,(93):123-132.
- [2] 胡开林.长身苦瓜品种资源聚类分析[J]. *广东农业科学*,2003,4: 20-26.
- [3] 张长远.苦瓜品种亲缘关系的RAPD分析[J]. *分子植物育种*,2005,3 (4):515-519.
- [4] De Pinho Pessoa, Marco Aurelio Caldas, Bloch Jr., Carlos, et al. Seed protein variation among pepper(*Capsicum* sp.) Genotypes revealed by Maldi-T of Analysis[J]. *Protein and Peptide letters*, 2004, 11(1):57-62.
- [5] 黄秀丽,庄东红,胡忠,等.南瓜属4个栽培种种子蛋白质电泳分析[J]. *武汉植物学研究*.2005,23(2):183-187.
- [6] 张谊寒.普通小麦品种间醇溶蛋白遗传多样性分析[J]. *西北植物学报*,2005,25(4):668-672.
- [7] 甘莉,王新.油菜种子贮藏蛋白质的遗传多样性分析[J]. *华中农业大学学报*,1999,18(6):529-532.
- [8] Moustakas M, Karakoli, S Yupsanis T. Seed protein electrophoresis for varietal identification in Rice(*Oryza sativa* L.) [J]. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 1992, 168 (2):95-99.
- [9] 汪沛洪.基础生物化学实验指导[M].西安:陕西科学技术出版社, 1986.
- [10] 颜启传.种子检验原理和技术[M].杭州:浙江大学出版社,2001.
- [11] 孙雁,冯锐,段利琴.杂交玉米及亲本种子碱溶蛋白质电泳鉴定[J]. *种子*,2000,5:17-19.
- [12] 刘来福.作物数量性状的遗传距离测定[J]. *遗传学报*,1979,6(1): 349-355.
- [13] 刘政国,王先裕,肖喜祝,等.主成分累计贡献率和性状选择对苦瓜遗传距离与产量杂种优势关系的影响[J]. *广西农业生物科学*, 2007,26(1):55-59.
- [14] 胡开林,付群梅,汪国平,等.苦瓜果色遗传的初步研究[J]. *中国蔬菜*, 2002,6:11-12.
- [15] 温庆放.不同来源苦瓜遗传亲缘关系的RAPD分析[J]. *福建农业学报*,2005,20(3):185-188.