

罗汉果不同倍性及其遗传关系的 FTIR 研究

闫海锋^{1,2}, 黄夕洋², 孔德鑫², 蓝金艳^{1,2}, 蒋水元^{2*}, 李 锋³, 李志刚¹

1 广西大学农学院, 广西南宁 530004

2 中国科学院广西植物研究所, 广西桂林 541006

3 广西科学院, 广西南宁 530003

摘 要 利用傅里叶变换红外光谱法 (FTIR) 测定了不同倍性(二倍体、三倍体、四倍体)罗汉果叶片的红外光谱,以不同波数段上的吸光度为指标,通过主成分分析和聚类分析研究了罗汉果的倍性差别及遗传关系。结果表明,罗汉果在倍性与亲缘遗传上表现出:倍性差别越大,在主成分三维排序图中的相对位置和聚类图中的遗传距离均越远,呈现出 $2\times < 3\times < 4\times$ 的规律;亲缘关系越远,遗传距离也越远;三倍体子代在母本相同时,不同的父本对其亲缘与遗传关系有一定的影响。由此可知,基于主成分分析和聚类分析的 FTIR 研究能在一定程度上揭示出罗汉果不同倍性的差别及其相互间的遗传关系。

关键词 罗汉果; 倍性; 遗传; 傅里叶变换红外光谱; 主成分分析; 聚类分析

中图分类号: O657.3 文献标识码: A DOI: 10.3964/j.issn.1000-0593(2011)06-1498-04

引 言

罗汉果 *Siraitia grosvenorii* (Swingle) C. Jeffrey 为葫芦科罗汉果属多年生攀援藤本植物,是 1977 年版《中国药典》收录中药和卫生部确定的药膳两用中药之一^[1];有润肺止咳、凉血滑肠之功效,用于治疗肺火燥咳、咽痛失音、肠燥便秘等疾病^[2,3];主产于广西永福、临桂和龙胜等县。目前罗汉果资源破坏与种质退化严重,果实品质有所下降,应用常规选育、杂交等育种技术难以大幅提高种质质量。多倍体育种是改良作物品质的重要手段,我国已成功对黄芩、宁夏枸杞、百合等药用植物进行了多倍体育种并获得推广使用,产生了巨大经济效益。因此运用多倍体育种技术进行罗汉果新品种开发是克服原有品种缺陷、推动罗汉果产业发展的有效途径。

通过研究遗传差异进行植物辅助育种已取得广泛应用,目前研究遗传关系多采用分子标记和同工酶标记技术,这些方法虽然结果准确,但实验费用较高、过程复杂、速度较慢。傅里叶变换红外光谱法 (FTIR) 具有整体特征性强、取样量少、简便迅速和准确等特点^[4],近年来在中药材的种质鉴定^[4]、太空育种^[5]等方面应用越来越广泛,目前利用 FTIR 法对不同倍性罗汉果之间的差异及其遗传关系的研究还未见

报道。因此,本文应用 FTIR 法测定了不同倍性罗汉果的叶片,运用主成分分析和聚类分析研究了罗汉果的倍性差异以及不同倍性间的遗传关系,旨在为多倍体特别是三倍体无籽罗汉果新品种的选育提供更加高效准确的方法和理论指导。

1 实验部分

1.1 材料来源

试验材料均采自广西桂林市兴安县漠川乡广西植物研究所和亦元生现代生物技术有限公司共建的罗汉果种植基地,

Table 1 Materials of variety and ploid used in the study

编号	品种	倍性
F204	农家品系(青皮果)	2×
F205	柏林 3 号(青皮果)	2×
F401	农家品系(青皮果)	4×
F403	柏林 3 号(青皮果)	4×
F302	♀ F403(4n) × ♂长滩果(Changtanguo)(2n)	3×
F322	♀ F403(4n) × ♂雄株 3 号(Male3)(2n)	3×
F311	♀ F401(4n) × ♂长滩果(Changtanguo)(2n)	3×
F323	♀ F401(4n) × ♂雄株 4 号(Male4)(2n)	3×

注: 4× 均为 2× 材料的同源四倍体

收稿日期: 2010-09-11, 修订日期: 2010-11-10

基金项目: 中国科学院“西部之光”人才培养计划资助项目(科发人教字[2009]236), 国家自然科学基金项目(40961019, 30960500), 广西科技攻关项目(桂科攻 0815005-2-2), 桂林科技攻关项目(20080103-1), 广西植物研究所基本科研业务费项目(09005) 资助

作者简介: 闫海锋, 1980 年生, 广西大学植物学专业在读硕士生 e-mail: gstsylhf@163.com

* 通讯联系人 e-mail: jsy@gxib.cn

分别选择生长状况良好的二倍体(2×)、三倍体(3×)、四倍体(4×)罗汉果雌株3~5株,每株各采集5张成熟叶片用于红外光谱测定。材料信息详见表1。

1.2 仪器和药品

Nicolet 5700 型红外光谱仪,DTGS 检测器,Nicolet OMNIC 7.3 软件,药品KBr为光谱纯(天津市光复精细化工研究所)。

1.3 测定方法

样品经105℃杀青30 min、50℃烘干、过200目筛后,以1:200比例与溴化钾碎晶混合,采用压片法测定,扫描范围4000~400 cm⁻¹,分辨率为4 cm⁻¹,扫描累加32次,扫描时扣除H₂O和CO₂干扰。

1.4 数据分析

根据8个不同倍性罗汉果叶片测定所得的FTIR光谱图,记录不同波数段上的吸光度,用SAS和SPSS11.5软件进行主成分分析和聚类分析,得到表征罗汉果不同倍性以及遗传关系的三维排序图和聚类图。

2 结果分析与讨论

2.1 不同倍性罗汉果叶片的红外光谱分析

红外光谱是分子振动光谱,是样品各主要化学成分的综合反映,通过红外光谱不仅可以确定分子的官能团,还可以通过谱图的比较反映样品在植化组成上的差异。所以种质、地域、储存等外界条件对植化组成及含量的影响,通过红外光谱均可反映出各自的差异性。

不同倍性罗汉果叶片的红外光谱见图1。从图中可以看出,不同倍性、不同亲缘遗传的罗汉果叶片谱图的峰形、峰位基本一致,但吸收峰强度有所不同。其中3334 cm⁻¹附近是—OH的伸缩振动,也有—NH₂的对称伸缩振动吸收;2923 cm⁻¹处为—CH₂反对称伸缩振动;1650 cm⁻¹附近是C=O的振动吸收,也有NH₂的变角振动吸收;1537 cm⁻¹附近是NH₃的对称变角振动;1442 cm⁻¹附近为芳香

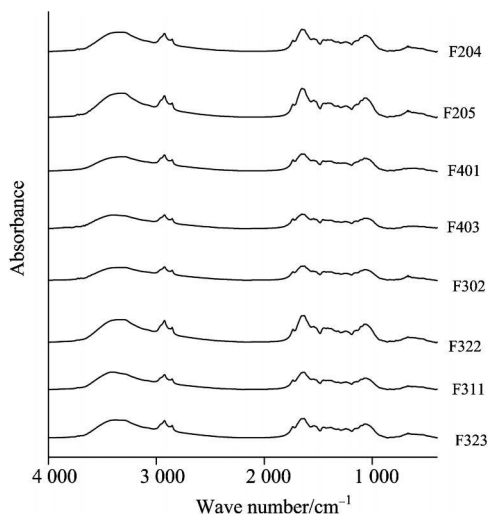


Fig 1 FTIR spectra of leaf of *Siraitia grosvenorii* in different ploidy

族亚硝基 N=O 伸缩振动;1238 cm⁻¹处是芳香酸酯、脂肪酸酯和内酯的C—O—C伸缩反对称伸缩振动吸收峰;1058 cm⁻¹附近是C—OH振动吸收峰;根据文献^[6-8]基本可确定其主要含有氨基酸,黄酮类等物质,这与前人^[9,10]研究结果一致。

2.2 不同倍性罗汉果叶片的主成分分析

运用主成分分析对不同倍性罗汉果叶片红外光谱数据进行计算,得到其主成分分析排序的三维散点图(图2)。第一主成分的累计贡献率为67.258%,前三个主成分的累计贡献率达到96.674%,所以前三个主成分可以反映罗汉果叶片的不同倍性之间的相关性和遗传关系。

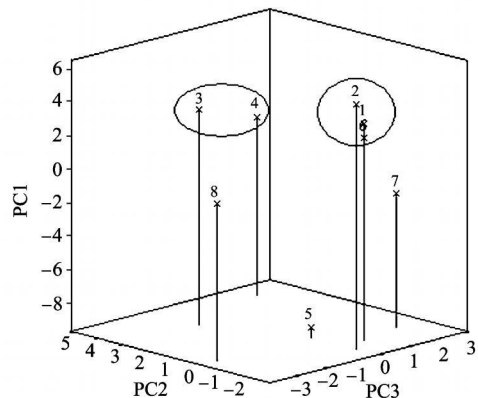


Fig 2 Three dimensional plot of FTIR spectra of leaf of *Siraitia grosvenorii* in different ploidy based on PCA

Notes: 1: F204; 2: F205; 3: F401;

4: F403; 5: F302; 6: F322; 7: F311; 8: F323

从主成分排序图中可以看出,罗汉果在图中的位置主要与其倍性和遗传有关。在倍性上,由于F401和F403是二倍体F204和F205的同源四倍体,两者倍性差异最大,倍性的增加使其化学成分含量也相应增加,即两者的含量差异也最大,所以二倍体(F204和F205)与四倍体(F401和F403)在图2中的距离最远;三倍体F302, F322, F311, F323基本上位于二、四倍体之间,结合前人的研究结果三倍体化学成分及含量介于二、四倍体之间,所以在主成分图中三倍体的位置居中;从总体可看出不同倍性罗汉果在图中的距离,呈现出倍性差异越大、距离越远,即2× < 3× < 4×的规律,所以不同倍性罗汉果之间的距离远近与其倍性差别基本吻合。

从亲缘、遗传分析上看,二倍体之间、以及四倍体之间,距离均很近,其中二倍体F204和F205位置最近,其次是其同源四倍体F401和F403,这是由于它们之间的倍性相同且均为青皮果品种、亲缘关系很近,图中的位置很好的反映了其亲缘、遗传关系的远近;但是二倍体与四倍体整体间的位置相距仍较远,这主要是由于其倍性差别所致,同时注意到两个四倍体间的距离没有二倍体间的近,推测可能由于在化学诱变加倍染色体时遗传物质变化,使得四倍体间化学成分及含量相差更大等原因引起。三倍体F302, F322, F311, F323因为亲本的不同彼此之间的位置相差比较大,在母本相同的情况下, F302与F322之间、以及F311与F323之间

的距离均较远,其中 F322 和 F323 与各自的母本距离更近;而且父本相同时,F302 与 F311 也仍有一段距离,F311 与其母本 F401 的距离更近;可见不同的父本和母本均对子代间的亲缘关系有一定的影响,但是亲本的遗传哪个影响更大,即子代倾向于母本还是父本的遗传,还有待做进一步深入的研究。

总之,由 FTIR 得出的主成分排序图中,罗汉果不同材料之间的相对位置宏观地反映出了由于倍性和亲缘、遗传关系的不同而造成的差异情况。

2.3 不同倍性罗汉果叶片的聚类分析

采用基于欧式距离的样本聚类分析,每两个样本间用类平均距离(Average linkage)连接,得到表征不同倍性罗汉果遗传关系的树系图(图 3)。从结果可以看出,8 个不同倍性罗汉果间的距离系数变化较小,在 0.003~0.030 之间;其中三倍体 F322 与二倍体 F204 间距离系数最小(0.003),与二倍体 F205 的距离次之(0.007),而三倍体 F302 与其他之间的距离系数最大。

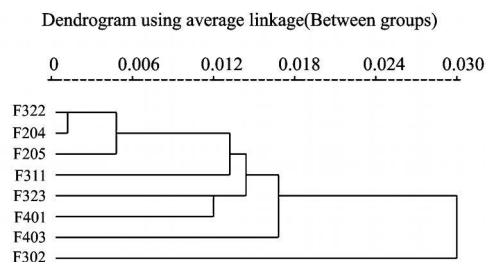


Fig 3 Dendrogram of FTIR spectra of leaf of *Siraitia grosvenorii* in different ploidy based on Euclidean distance index

分步聚类结果显示:F322, F204, F205 首先聚为一类,再依次与 F311, F323 和 F401、F403 相聚,最后则与 F302 聚类。聚类图以距离水平也主要表明了不同倍性罗汉果间的亲缘、遗传关系,而且比主成分三维图更直观。以 F403(4n, 柏林 3 号, 青皮果)为母本时,由于父本的不同,三倍体子代间 F322 与 F302 距离最大,其中 F322 与母本的距离系数比 F302 的更小,即 F322 与母本的亲缘关系更近;若以 F401(4n, 农家品系, 青皮果)为母本,子代 F323 比 F311 更接近母本;此外,长滩果为父本时,子代 F311 与母本(F401)的距离系数比 F302 与其母本(F403)的距离系数小;因此,我们也可知由于亲本的不同,子代的亲缘遗传关系不同,特别是在母本相同的情况下,由于父本遗传作用影响的不同,使得子代与母本间的距离不同;所以从聚类图中可以更精确地看出, F322, F204 与 F205 遗传关系最近, F311、F323 和 F401、F403 间也较近, F302 与其他之间遗传关系最远,这与主成分分析的结果相互印证。

3 结 论

在同一地理位置和相同气候条件下,罗汉果主要由于基因等的影响而在红外光谱图中表现出一定差异;本文对红外光谱数据通过多元统计的主成分与聚类分析进行研究,以主成分三维散点图和直观的树状聚类图呈现了不同倍性罗汉果的差异,其中包括亲本与子代的遗传差异,两者结果相互印证,在一定程度上很好地说明了罗汉果间倍性以及遗传的关系;因此,通过基于主成分和聚类分析的 FTIR 可快速准确地为多倍体罗汉果特别是三倍体罗汉果新品种的选育提供科学依据,这种快速又直观科学的研究方法将在药用植物多倍体育种方面有很好的应用价值。

References

- [1] ZENG Xiang-lin(曾祥林). Journal of Guangxi Medicine(广西医学), 2009, 31(8): 1182.
- [2] HUANG Zhi-jiang, HUANG Jie(黄志江, 黄捷). Journal of Guangxi Normal University(广西师范大学学报), 1998, 16(4): 75.
- [3] JU Wei, CHENG Yun-yan, ZHANG Jian(鞠伟, 程云燕, 张健). Guangxi Journal of Light Industry(广西轻工业), 2001, 4: 4.
- [4] XU Rong, SUN Su-qin, LIU You-gang, et al(徐荣, 孙素琴, 刘友刚, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2010, 30(4): 897.
- [5] ZHU Yan-ying, GUAN Ying, WANG Li-peng, et al(朱艳英, 关颖, 王立鹏, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2010, 30(1): 345.
- [6] HE Shu-mei, QIAO Lan-xia, LIU Jing-lan(何书美, 乔兰侠, 刘敬兰). Journal of Analytical Science(分析科学学报), 2008, 24(2): 202.
- [7] LI Qing-yu, SI Min-zhen, DONG Qin, et al(李清玉, 司民真, 董勤, 等). Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory(光谱实验室), 2007, 24(2): 249.
- [8] LI Qing-yu, SI Min-zhen, DENG Li-lan, et al(李清玉, 司民真, 邓莉兰, 等). The Journal of Light Scattering(光散射学报), 2008, 20(2): 165.
- [9] CHEN Quan-bin, YANG Jian-xiang, CHENG Zhong-quan, et al(陈全斌, 杨建香, 程忠泉, 等). Journal of Guangxi Sciences(广西科学), 2005, 12(1): 44.
- [10] CHEN Quan-bin, YI Xiang-hui, HE Xing-cun(陈全斌, 义祥辉, 何星存). Journal of Beverage Industry(饮料工业), 2005, 8(4): 29.

Study on Different Ploidy *Siraitia Grosvenorii* and Their Genetic Relationship by FTIR

YAN Hai-feng^{1, 2}, HUANG Xi-yang², KONG De-xin², LAN Jiu-yan^{1, 2}, JIANG Shu-yuan^{2*}, LI Feng³, LI Zhi-gang¹

1. College of Agriculture, Guangxi University, Nanning 530004, China

2. Guangxi Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Guilin 541006, China

3. Guangxi Academy of Sciences, Nanning 530003, China

Abstract *Siraitia grosvenorii* was an important Chinese traditional medicine. The spectra of leaf of diploid, triploid and tetraploid *Siraitia grosvenorii* were determined by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) with OMNI sampler directly, fast and accurately. And based on the indices of wave number-absorbance from different bands and through comparison of differences of these infrared spectra the ploidy difference and genetic relationship of *Siraitia grosvenorii* were studied by the methods of principal component analysis (PCA) and cluster analysis. The results showed that for the ploidy, the position relationship of PCA three-dimensional-plot and the distance coefficient of clustering analysis plot between diploid and tetraploid were most remarkably different, and the triploid was basically between diploid and tetraploid, so the ploidy was more different, the position relationship of PCA and the distance coefficient of clustering analysis were further, and the law was: $2 \times < 3 \times < 4 \times$. At the same time, the genetic relationship was further with each other while the position relationship of PCA and distance coefficient of clustering analysis was further too. And the genetic relationship of triploid was affected by the different male parent while their female parent was the same one. Therefore, using FTIR based on PCA and cluster analysis we could reveal the difference of ploidy and the genetic relationship between *Siraitia grosvenorii* to a certain extent. FTIR could be used for excellently polyploidy species breeding of *Siraitia grosvenorii*.

Keywords *Siraitia grosvenorii*; Ploidy; Genetic; Fourier transform infrared spectroscopy; Principal component analysis; Cluster analysis

(Received Sep. 11, 2010; accepted Nov. 10, 2010)

* Corresponding author