

· 中药农业 ·

广藿香化学诱变植株SRAP遗传特性及质量研究[△]李成梅¹, 李莹莹¹, 刘键鍾¹, 曾建荣², 林明鑫¹, 严寒静^{1*}, 庞玉新^{3*}

1. 广东药科大学 中药学院, 广东 广州 510006;

2. 广东潮州卫生健康职业学院, 广东 广州 515632;

3. 广东药科大学 中药资源学院, 广东 广州 527300

[摘要] 目的: 研究广藿香化学诱变植株的遗传特性和品质差异。方法: 以前期经氟乐灵、亚硝酸钠及亚硫酸钠诱变后筛选出的变异植株为材料, 对其基因组 DNA 进行相关序列扩增多态性 (SRAP) 分析, 并测定其主要有效成分含量。结果: 10 对 SRAP 引物扩增的总位点数为 235 个, 其位点数为 16~29 个, 而多态位点数为 220 个, 平均多态性百分比达 86.96%; 广藿香变异植株的遗传相似系数为 0.445~0.938, 其变异程度大于不同产地种群间的变异程度; 当遗传相似系数为 0.55 时, 变异程度较大的植株 N1a、N1b、N1c、S4c、S4d、S6c 聚为一类, 其他与 CK 聚为另一类。变异植株主要化学成分百秋季醇及广藿香酮含量与 CK 差异均有统计学意义 ($P<0.05$), 其中变异植株 F1、F2a、F4a、F4d、F4e、F6e、F8i、N2c、N2d 的广藿香酮明显升高, 且高于百秋季醇的含量, 由“醇型”广藿香转变为“酮型”广藿香; 变异植株 F4c、F6d、F8j、N1a、N1b、N1c、S3b、S4c、S4d、S6b、S6c 的百秋季醇或广藿香酮含量均显著高于 CK。结论: 化学诱变是广藿香新品种选育的有效途径, 可提高其遗传多态性, 影响其有效成分的合成和积累; 变异植株 F1、F2a、F4a、F4b、F4d、F4e、F6e、F8i、F10d、N2c、N2d、N1a、N1b、N1c、S4c、S4d、S6c 具有开发潜能, 可为后续研究提供材料。

[关键词] 广藿香; 化学诱变; 相关序列扩增多态性分子标记; 百秋季醇; 广藿香酮

[中图分类号] R282;R284 [文献标识码] A [文章编号] 1673-4890(2023)01-0107-08

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20220815004

Genetic Characteristics and Quality of Chemically Mutagenized Plants SRAP of *Pogostemon cablin*

LI Cheng-mei¹, LI Ying-ying¹, LIU Jian-zhong¹, ZENG Jian-rong², LIN Ming-xin¹, YAN Han-jing^{1*}, PANG Yu-xin^{3*}

1. School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;

2. Guangdong Chaozhou Health Vocational College, Guangzhou 515632, China;

3. School of Traditional Chinese Medicine Resources, Guangdong Pharmaceutical University,
Guangzhou 527300, China

[Abstract] **Objective:** To study the genetic characteristics and quality differences of chemically mutagenized plants of *Pogostemon cablin*. **Methods:** The mutant plants screened by trifluralin, sodium nitrite, and sodium sulfite mutagenesis in the previous stage were used as materials, the sequence-related amplified polymorphism (SRAP) analysis was carried out on their genomic DNA, and the content of its main effective components was determined. **Results:** The total number of loci amplified by 10 pairs of SRAP primers was 235, ranging from 16 to 29. The number of polymorphic loci was 220, and the average polymorphism percentage was 86.96%. The genetic similarity coefficient of variant plants of *P. cablin* ranged from 0.445 to 0.938, and the degree of variation was greater than that among populations from different producing areas. When the genetic similarity coefficient was 0.55, the plants N1a, N1b, N1c, S4c, S4d, and S6c with a large degree of variation were clustered into one category, and the others and CK were clustered into another category. The content of the main chemical components patchouli alcohol and patchoulenone in the variant plants was significantly different from that in CK ($P<0.05$). Among them, the content of patchoulenone in the variant plants F1, F2a, F4a, F4d, F4e, F6e, F8i, N2c, and N2d was

[△] [基金项目] 国家自然科学基金项目 (81773829); 广东省重点领域研发计划项目 (2020B020221002)

* [通信作者] 严寒静, 教授, 研究方向: 中药资源开发与品质评价; Tel: 020-39352176, E-mail: yanhanjing1211@163.com
庞玉新, 研究员, 研究方向: 中药资源开发与品质评价; Tel: 020-39352176, E-mail: pyxmarx@126.com

significantly increased, higher than that of patchouli alcohol, which turned *P. cablin* from patchouli alcohol-type to patchoulenone-type. The content of patchouli alcohol and patchoulenone in the mutant plants F4c, F6d, F8j, N1a, N1b, N1c, S3b, S4c, S4d, S6b, and S6c was significantly higher than those in CK. **Conclusion:** Chemical mutagenesis is an effective way of breeding new *P. cablin* varieties, which can improve its genetic polymorphism and influence the synthesis and accumulation of its effective components. The mutant plants F1, F2a, F4a, F4b, F4d, F4e, F6e, F8i, F10d, N2c, N2d, N1a, N1b, N1c, S4c, S4d, and S6c have development potential and provide materials for subsequent research.

[Keywords] *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.; chemical mutagenesis; sequence-related amplified polymorphism; patchouli alcohol; patchoulenone

广藿香 *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. 是唇形科刺蕊草属植物，以干燥地上部入药，具有芳香化湿、温和脾胃、发表解暑的功效^[1]，被历代医家视为治疗暑湿之症的要药。广藿香中挥发性成分百秋季醇和广藿香酮被认为是其主要活性成分，具有抗炎、抗菌、抗疟原虫及调节胃肠道的作用^[2]。因不同产地广藿香的化学成分种类和含量具有明显差异，研究者根据百秋季醇和广藿香酮含量变化及两者的比值，将广藿香酮含量较高的广藿香划分为“酮型”、广藿香醇含量较高的广藿香划分为“醇型”，且传统经验认为“酮型”广藿香品质最优、疗效最佳^[3]。

近年来，广藿香需求量增大，资源日益枯竭，加之种质资源退化，无法满足医疗美容企业和制药企业对中药材原料的需求^[4-5]。开发新的育种技术是解决市场供求矛盾行之有效的方法，而进行良种选育是获得优质、高产药材的有效途径。由于广藿香自原产地引入我国后很少开花，即使开花也不结实，因此多以扦插方式繁殖，而传统的育种方法繁殖速度较慢、种质资源不足，急需寻找新的育种手段以加速广藿香新品种选育进程^[6]。植物组织培养与人工化学诱变技术相结合的育种方法已取得较好效果，且逐渐引入到药用植物新品种选育中^[7]。

化学诱变是人工获取突变体常用的手段之一。目前，氟乐灵已被广泛用于植物的诱变育种，其诱导机制与秋水仙素相同，但前者对人体的伤害更小、效率更高且经济实惠，如利用氟乐灵处理半枝莲 *Scutellaria barbata* D. Don、甜叶菊 *Stevia rebaudiana* (bertoni) Hemsl.、大蒜 *Allium sativum* L.、萱草 *Hemerocallis fulva* (L.) L 等可以获得性状优良的突变体植株^[8-12]。亚硫酸钠、亚硝酸钠和甲基磺酸乙酯 (EMS) 的诱变原理相似，均是直接作用于DNA，增加点突变频率，减少染色体畸变。同时，前两者具有毒性较弱、价格低廉等优点，可作为无机类诱变剂用于高产及耐性细菌菌株的筛选。

例如，经亚硝酸钠处理后的水稻 *Oryza sativa* L. 可获得高结实率的后代突变体，亚硫酸钠诱导寒兰 *Cymbidium kanran* Makino 原球茎可获得不同类型的变异植株^[13-14]。基于此，本研究利用以上3种化学诱变剂对广藿香无菌苗进行诱变处理，继而对筛选出的广藿香变异植株进行遗传多样性及质量差异研究，以期为后续广藿香新品种选育提供参考。

1 材料

1.1 样品

广藿香无菌丛生芽购自遂溪鑫兴农科技农业有限公司，经广东药科大学中药学院严寒静教授鉴定为广藿香 *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.，且为“醇型”广藿香。

1.2 仪器

Q5000型超微量紫外-可见分光光度计（美国Quawell公司）；T100型聚合酶链式反应（PCR）仪（瑞士Bio-Rad公司）；DYZC-24A型电泳仪（北京市六一仪器厂）；7890B-7000D型气相色谱-质谱联用（GC-MS）仪（美国Agilent Technologies Inc公司）；RE-52A型旋转蒸发仪（上海亚荣生化仪器厂）；BP211D型十万分之一电子分析天平（德国赛多利斯公司）。

1.3 试药

氟乐灵（批号：S18178，上海源叶生物科技有限公司）；植物基因组DNA提取试剂盒（批号：ZP309，庄盟生物科技有限公司）；亲和硅烷（批号：B8150）、剥离硅烷（批号：R8070）均购于北京索莱宝科技有限公司；30%丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺（批号：A853851）、四甲基乙二胺（批号：N818999）均购于上海麦克林生化科技有限公司；对照品广藿香酮（批号：G-055-180710）、百秋季醇（批号：B-037-180122）均购自成都瑞芬思生物科技有限公司。

有限公司, 纯度≥98%; 正十八烷(批号: 0110583, 纯度>98%, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 正己烷(批号: 5067-1511, 色谱纯, 天津市致远化学试剂有限公司); 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 变异植株的诱导

根据预实验, 设置氟乐灵浓度为1、2、4、6、8、 $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 亚硫酸钠浓度分别为0.004、0.008、0.012、 $0.016\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 亚硝酸钠浓度分别为0.007、0.014、 $0.021\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 不添加氟乐灵、亚硫酸钠、亚硝酸钠的处理为CK。取1 cm左右生长基本一致、健壮的广藿香丛生芽置于上述不同浓度的试液中, 分别浸泡24、48、72 h, 于温度为25 °C的黑暗条件下, 以 $60\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 速度在摇床上摇动; 用无菌水清洗后, 转接到生根培养基上培养, 每个处理3个重复, 每个重复接种6瓶, 每瓶接种5个芽。

根据后期农艺性状指标分析结果及外观形态, 初步筛选得到的24株广藿香变异植株。其中, 氟乐灵处理组14株、亚硝酸钠处理组5株、亚硫酸钠处理组5株, 各变异植株编号及性状见表1。

表1 广藿香变异植株编号及分类

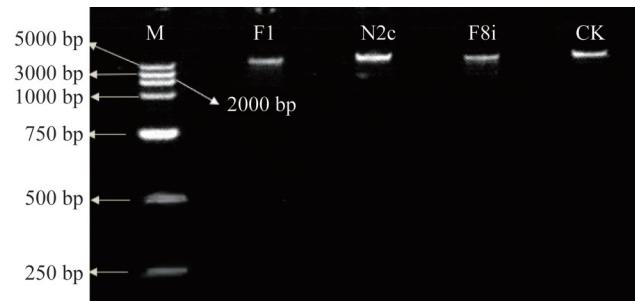
组别	变异植株编号	性状描述
I	F8a、F8j、N2d	三叶轮生, 矮化株, 节间短
II	F8i	叶片大、墨绿色, 多分支, 矮化株, 茎节短, 细茎
III	F2a、F4c、F6c、F6e	叶片大、墨绿色, 植株高
IV	F4a、F4b、F4d、F4e、F6d、F10d	叶片绿色, 多分支
V	N1a、N1b、N1c、S6c、S4c	叶片深绿色, 茎节短, 细茎
VI	F1、N2c	矮化株, 叶片极小, 多分支, 茎节短, 细茎
VII	S3b、S6b	高植株, 叶片大、深绿色
IX	S4d	高植株, 叶片大、深绿色, 节间长, 粗茎

注: 编号F为氟乐灵处理组, 编号内数字1、2、4、6、8、10为不同浓度, 单位 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 编号N为亚硝酸钠处理组, 编号内数字1、2代表浓度为0.007、 $0.014\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 编号S为亚硫酸钠处理组, 编号内数字3、4、6代表浓度为0.008、 $0.012\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; a~j代表植株数为1~10。

2.2 相关序列扩增多态性(SRAP)分子标记

2.2.1 DNA提取与检测 采集筛选出的24株广藿香变异植株与CK幼嫩叶若干, 存放于-20 °C冰箱备用。采用植物基因组DNA提取试剂盒方法提取叶片基因组总DNA, 超微量紫外-可见分光光度计检测DNA的纯度及浓度, 用0.1%琼脂糖凝胶电泳检

测样品。如图1所示, 广藿香DNA电泳条带清晰明亮, 无脱尾现象, 说明DNA无明显降解, 完整度较好。经超微量分光光度计检测, DNA的260 nm与280 nm处吸光度比值为1.7~2.0, 纯度较好, 可用于SRAP-PCR扩增。



注: M. Marker。

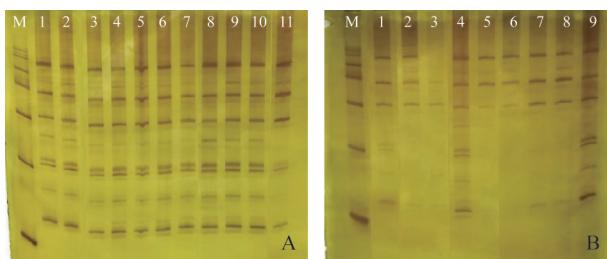
图1 部分广藿香变异植株基因组DNA电泳图

2.2.2 SRAP-PCR反应 根据前期实验结果筛选出10对引物(由北京擎科生物科技有限公司合成), 序列见表2。PCR反应总体积50 μL, 其模板DNA(20 ng)1 μL、PCR预混合物(Premix)25 μL, 上下游引物各1 μL, ddH₂O补全至50 μL。PCR扩增程序: 94 °C预变性5 min; 94 °C变性1 min, 35 °C复性1 min, 72 °C延伸1 min, 5个循环; 94 °C变性1 min, 50 °C复性1 min, 72 °C延伸1 min, 35个循环; 循环结束后72 °C延伸7 min, 4 °C保存。扩增反应程序在T100型PCR仪上进行。反应完成后, 对SRAP-PCR产物采用6%非变形聚丙酰胺凝胶电泳法检测。变异植株SRAP-PCR扩增结果见图2。如表3所示, 10对SRAP引物扩增的总位点数为235个, 其位点数为16~29个, 而多态位点数为220个, 平均多态性百分比达86.96%, 多态性百分比为43.48%~100.00%。除了引物对ME11EM7的多态百分比为43.48%外, 其他引物对均表现出极高的多态性, 其中ME7EM5、ME10EM17、ME10EM18引物组合多态性百分数达100.00%, 表明广藿香变异植株分子水平差异较大。

2.2.3 广藿香变异植株的遗传相似性及聚类分析 通过NTSYSpc-1.0软件对25株广藿香材料进行遗传相似性分析结果表明, 与CK相比, 广藿香变异植株的遗传相似系数为0.445~0.938, 说明广藿香变异植株在分子水平上具有一定程度的变异。多数研究表明, 遗传相似系数越小, 遗传距离越大, 说明植物细胞遗传物质基础的相似程度越小。变异

表2 广藿香SRAP-PCR反应引物序列信息

编号	上游引物(3'→5')
ME1	TGAGTCCAAACCGGATA
ME2	TGAGTCCAAACCGGAGC
ME3	TGAGTCCAAACCGGACC
ME7	TGAGTCCAAACCGGTGC
ME10	TGAGTCCAAACCGGAGG
ME11	TGAGTCCAAACCGGAAA
ME13	TGAGTCCAAACCGGAGA
EM2	GACTGCGTACGAATTGTC
EM5	GACTGCGTACGAATTAAC
EM6	GACTGCGTACGAATTGCA
EM7	GACTGCGTACGAATTGTA
EM10	GACTGCGTACGAATTCAC
EM17	GACTGCGTACGAATTAG
EM18	GACTGCGTACGAATTAGC



注：A中1~11为样品CK、F2a、F4a、F4b、F4c、F4d、F4e、F6c、F6d、F6e、F10d；B中1~9为样品S3b、S4c、S4d、S6b、S6c、N1a、N1b、N1c、CK；M为2000 bp的Marker；引物对为ME13EM6。

图2 广藿香SRAP-PCR扩增结果

表3 广藿香10对引物多态性统计结果

编号	总位点数/个	多态性位点数/个	多态性百分数/%
ME1EM10	30	23	76.67
ME2EM6	32	29	90.63
ME2EM7	31	25	80.65
ME3EM7	28	27	96.43
ME7EM2	23	22	95.65
ME7EM5	27	27	100.00
ME10EM17	16	16	100.00
ME10EM18	25	25	100.00
ME11EM7	23	10	43.48
ME13EM6	18	16	88.89

程度较大的植株有N1a、N1b、N1c、S4c、S4d、S4e、S6c、S6d，其遗传相似系数为0.445~0.533，而S4d的遗传相似系数最小，为0.445，说明其在分子水平发生的变异程度最大。

将筛选出的10对引物对25份广藿香样品扩增出的条带作为原始矩阵，利用MEGA 7软件通过

UPGMA法进行聚类分析，得出广藿香变异植株不同类型与CK间的树状图（图3）。由图可以看出，当遗传相似系数为0.54时，广藿香变异植株及CK可分为两大类。第1类与CK聚为一大支的变异植株，分支内当遗传相似系数在0.83时，又可将其分为3亚类，即S3b聚为一支，F8a、F8i、F8j、N2c、N2d、F1、S6b聚为一支，剩下变异植株与CK聚为一支；第2类包括S4c、S6c、N1a、N1b、N1c、S4d，且在遗传相似系数为0.66时，S4d单独聚为一支。综上可知，S4c、S4d、S6c、N1a、N1b、N1c在分子水平发生的变异程度更高。

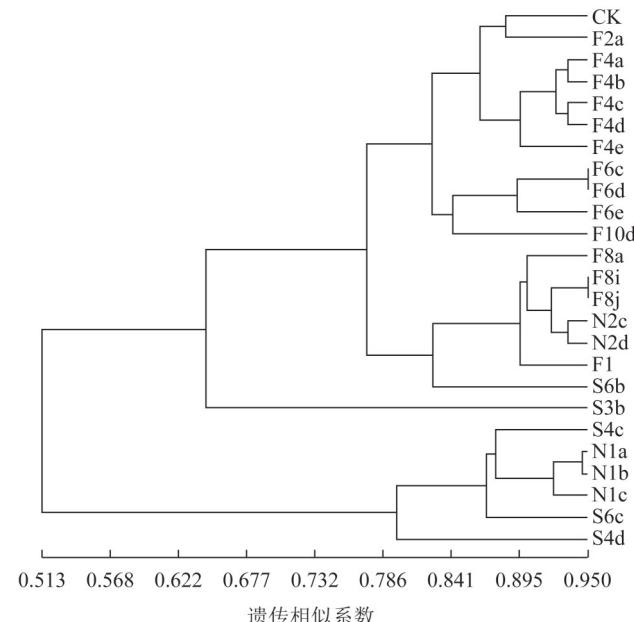


图3 基于UPGMA法的广藿香变异植株聚类树

2.3 GC-MS分析条件

2.3.1 GC条件 色谱柱：DB-5MS毛细管柱($30\text{ m} \times 0.25\text{ mm}, 0.25\text{ }\mu\text{m}$)，程序升温：初始温度 $120\text{ }^\circ\text{C}$ ，保持2 min；以 $2\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 速率升温至 $160\text{ }^\circ\text{C}$ ，保持2 min；以 $10\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 速率升温至 $180\text{ }^\circ\text{C}$ ，保持2 min；以 $30\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 速率升温至 $280\text{ }^\circ\text{C}$ ，保持0 min；进样量为 $1\text{ }\mu\text{L}$ ；分流比为 $30:1$ ；载气为高纯氮气；柱箱温度为 $120\text{ }^\circ\text{C}$ ；进样口温度为 $250\text{ }^\circ\text{C}$ ；接口温度为 $250\text{ }^\circ\text{C}$ 。

2.3.2 MS条件 电子轰击离子源(EI)：离子源温度： $200\text{ }^\circ\text{C}$ ；电离能量： 70 eV ；扫描质量范围 m/z : 50~500；溶剂延迟：2 min。标准库为NIST14.lib。

2.4 溶液的制备

2.4.1 对照品溶液的制备 分别精密称取百秋李

醇、广藿香酮对照品适量，用正己烷溶液对其分别定容，制得 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 对照品溶液。

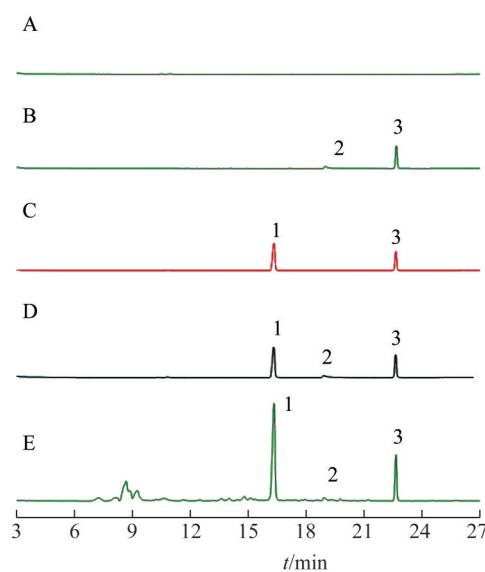
2.4.2 内标溶液的制备 精密称取正十八烷 25 mg ，加入正己烷溶解并定容至 25 mL ，制得 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 正十八烷内标溶液。

2.4.3 供试品溶液的制备 参考胡贞贞等^[5]的研究方法对样品进行提取，条件稍作优化。取样品粉末约 0.3 g 于锥形瓶中，加入二氯甲烷 30 mL ，超声(250 W , 40 kHz)，温度低于 $38\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，每次 20 min ，重复3次，滤过后合并滤液，挥干溶剂，将残渣加入正己烷溶解并定容至 5 mL ，摇匀，微孔滤膜滤过，即得供试品溶液。

2.4.4 专属性考察 取**2.4.1**项下对照品溶液按一定比例稀释后，加入定量的内标溶液，配制成对照品内标溶液和广藿香酮、百秋季醇内标溶液，同时取**2.4.3**项下的供试品溶液，按照**2.3**项下条件进行测定。结果表明，供试品溶液中其他成分对待测成分无干扰，分析方法专属性良好(图4)。

2.4.5 线性范围考察 精密吸取**2.4.1**项下一定量的百秋季醇及广藿香酮对照品溶液，用正己烷溶液稀释，配制一系列不同浓度的溶液。按照**2.3**项下条件进行测定，测定结果以配制的溶液浓度为横坐标(X)，对照品与内标峰面积比值为纵坐标(Y)进行线性回归。百秋季醇的回归方程为 $Y=80.5061X+0.0197$ ($r=0.9999$)，表明其在 $0.01\sim0.50\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 具有良好的线性关系；广藿香酮的回归方程为 $Y=11.892X-0.1135$ ($r=0.9993$)，表明其在 $0.01\sim0.10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 具有良好的线性关系。

2.4.6 精密度试验 精密吸取**2.4.1**项下百秋季醇及广藿香酮对照品溶液，用正己烷溶液按一定比例稀释，按照**2.3**项下条件进行测定，连续进样6次。结果显示，百秋季醇及广藿香酮的相对峰面积RSD分别为 0.53% 、 0.99% ，表明仪器精密度较好。



注：A. 空白溶剂；B. 广藿香酮内标溶液；C. 百秋季醇内标溶液；D. 广藿香酮、百秋季醇内标溶液；E. 供试品溶液；1. 百秋季醇；2. 广藿香酮；3. 内标。

图4 空白、对照品内标及供试品溶液的色谱图

2.4.7 重复性试验 取同一份CK样品粉末9份，根据**2.4.3**项下方法制备供试品溶液，按照**2.3**项下条件进行测定。结果显示，百秋季醇及广藿香酮的相对峰面积RSD分别为 4.56% 、 4.97% ，表明该方法重复性较好。

2.4.8 稳定性试验 精密取同一CK样品溶液，按照**2.3**项下条件分别在 0 、 2 、 4 、 6 、 8 、 10 、 12 、 24 、 48 h 进行测定。结果显示，百秋季醇和广藿香酮的相对峰面积RSD分别为 0.91% 、 2.62% ，表明供试品溶液在 48 h 内稳定。

2.4.9 加样回收率试验 称取6份已知含量的同一份CK样品粉末约 0.15 g ，按照**2.4.3**项下方法制备供试品溶液，精密加入与样品中百秋季醇、广藿香酮等量的2种对照品储备液，按**2.3**项下条件进行测定，结果见表4。

表4 广藿香加样回收率试验结果

称样量/g	样品中含量/mg		对照品加入量/mg		测得量/mg		回收率/%		平均回收率/%		RSD/%	
	百秋季醇	广藿香酮	百秋季醇	广藿香酮	百秋季醇	广藿香酮	百秋季醇	广藿香酮	百秋季醇	广藿香酮	百秋季醇	广藿香酮
0.1527	1.74	0.31	1.74	0.31	3.35	0.64	96.04	103.27	97.02	102.93	0.71	2.98
0.1519	1.74	0.31	1.74	0.31	3.40	0.66	97.89	106.54				
0.1512	1.73	0.31	1.73	0.31	3.34	0.63	96.56	102.54				
0.1501	1.72	0.31	1.72	0.31	3.34	0.61	97.32	100.60				
0.1507	1.72	0.31	1.72	0.31	3.36	0.64	97.56	104.19				
0.1512	1.73	0.31	1.73	0.31	3.34	0.62	96.74	100.47				

2.4.10 广藿香变异植株中主要化学成分含量测定 取筛选出的24株广藿香变异植株及CK样品3批, 按照2.4.3项下方法制备供试品溶液, 按2.3项下条件进行测定, 结果见表5(质谱图见图5、色谱图见图6)。变异植株含量均与CK含量差异有统计学意义($P<0.05$), 大致可分为6种类型。第1类: 百秋季醇含量降低、广藿香酮含量升高, 且广藿香酮含量高于百秋季醇含量, 其中F4d、F4e的广藿香酮含量增加最为明显, 分别为CK的3.9、5.3倍。第2类: 百秋季醇含量无明显变化、广藿香酮含量降低, 特别是F8a, 其广藿香酮比CK降低了1.8倍。第3类: 百秋季醇含量无变化、广藿香酮含量升高, 其中F4b广藿香酮含量升高最为明显, 为CK的3倍。第4类: 百秋季醇、广藿香酮含量都升高, 且F4c的百秋季醇及广藿香酮含量大约为CK的1.5、2.0倍。第5类: 百秋季醇降低、广藿香酮含量无明显变化。第6类: 百秋季醇含量升高、广藿香酮含量无变化。综合来看, 除第2类、第5类型变异植株外, 其他类型变异植株均可作为后续广藿香高品质育种研究, 改善植物药用价值。

3 讨论

3.1 广藿香变异植株遗传多样性水平

SRAP分子标记技术能够直接反应生物在DNA水平的变化, 全面反映物种的遗传信息且不受外界环境因素的影响^[16]。SRAP具有随机扩增多态性DNA标记(RAPD)技术和扩增片段长度多态性(AFLP)技术的双重优点, 且不需要预先设计引物即可直接进行PCR扩增, 已被广泛用于何首乌、马铃薯及茄果蔬菜等的生物遗传多样性分析研究中^[17-19]。高彦辉等^[20]运用SRAP分子标记对航天诱变后的辣椒后代材料进行遗传多样性分析, 结果证实航天诱变能够导致辣椒种子在DNA水平发生变异, 且部分变异杂交种能够稳定遗传。广金钱草化学诱变植株SRAP分子标记结果表明, 化学诱变处理后的广金钱草在基因组水平上存在较大差异, 且变异程度大于不同种源地的变异^[21]。利用SRAP及简单重复序列标记(SSR)分子标记技术对EMS处理后的甘蓝型油菜DNA进行遗传多样性分析结果表明, EMS诱导后的材料产生了分子水平上可检测的突变, 且诱变材料后代之间存在广泛的遗传差异^[22]。在本研究中, 利用SARP分子标记技术对广藿香变异植株及CK进行遗传多样

表5 广藿香变异植株百秋季醇和广藿香酮质量分数

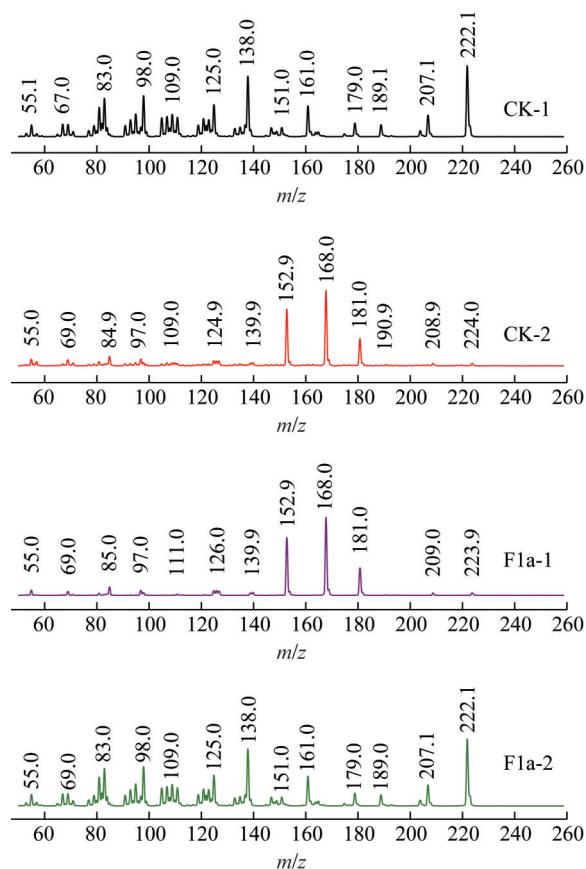
($\bar{x}\pm s, n=3$)

编号	百秋季醇	广藿香酮	%
CK	0.692 6±0.282 4	0.324 4±0.174 4	
F1	0.178 8±0.003 6*	0.534 2±0.014 2*	
F2a	0.483 6±0.032 1*	0.573 5±0.030 9*	
F4e	0.480 6±0.060 2*	1.731 3±0.206 0*	
F8i	0.205 0±0.003 4*	0.498 9±0.007 9*	
N2c	0.309 7±0.005 7*	0.665 3±0.039 6*	
F4a	0.189 9±0.060 2*	0.758 6±0.045 9*	
F4d	0.506 7±0.069 3*	1.277 8±0.208 3*	
F6e	0.233 6±0.004 7*	0.707 7±0.019 5	
F10d	0.316 4±0.027 1*	0.853 3±0.113 3*	
N2d	0.393 3±0.050 4*	0.837 3±0.174 1*	
F8a	0.651 2±0.043 5	0.253 4±0.008 8*	
F6d	0.580 4±0.010 3	0.470 8±0.009 0*	
F4b	0.635 9±0.029 4	0.974 8±0.090 4*	
S4c	0.744 0±0.015 2	0.686 1±0.012 6*	
F8j	0.814 3±0.003 1	0.680 2±0.048 8*	
N1b	0.710 2±0.033 1	0.677 2±0.128 5*	
S4d	0.629 3±0.017 6	0.466 1±0.020 8*	
F4c	0.991 3±0.045 1*	0.653 0±0.077 7*	
N1c	0.872 1±0.047 3*	0.634 0±0.057 5*	
N1a	0.879 8±0.043 2*	0.458 9±0.013 3*	
F6c	0.488 7±0.007 1*	0.208 6±0.004 6	
S3b	0.875 7±0.043 4*	0.309 2±0.014 5	
S6b	1.330 4±0.081 1*	0.274 3±0.028 2	
S6c	0.979 6±0.049 0*	0.277 6±0.095 5	

注: 与CK比较, * $P<0.05$; 第1类包括F1、F2a、F4e、F8i、N2c、F4a、F4d、F6e、F10d、N2d植株; 第2类包括F8a植株; 第3类包括F6d、F4b、S4c、F8j、N1b、S4d植株; 第4类包括F4c、N1c、N1a植株; 第5类包括F6c植株; 第6类包括S3b、S6b、S6c植株。

性分析发现, 化学诱变剂处理后的广藿香变异植株多态性较高, 平均多态性百分比达86.96%, 表明化学诱变剂对广藿香分子水平影响具有一定的差异性。本研究中, 广藿香变异植株的遗传相似系数为0.445~0.938, 小于不同产地广藿香种群间遗传相似系数(0.6367~0.9925)^[23], 说明广藿香经化学诱变剂处理过后, 其变异程度大于不同产地种群间的变异。

聚类分析结果表明, 广藿香经化学诱变剂处理后发生了不同程度的变异。当遗传相似系数为0.55时, 氟乐灵处理后的所有变异植株均与CK聚为一类, 这表明经氟乐灵诱变处理后的广藿香变异频率



注: CK-1、CK-2分别为CK百秋季醇、广藿香酮的质谱图; F1a-1、F1a-2分别为变异植株F1a广藿香酮、百秋季醇的质谱图。

图5 CK及广藿香变异植株F1a百秋季醇、广藿香酮质谱图

较小;而亚硫酸钠及亚硝酸钠诱变处理后的变异植株多聚为另一支,说明两者诱发广藿香植株突变的频率高于氟乐灵。推测这可能与化学诱变剂的诱发机理有关,氟乐灵诱发的基因突变主要以染色体加倍为主,而亚硫酸钠及亚硝酸钠主要作用于DNA,使DNA结构及复制紊乱。综上所述,在分子水平发生变异较大的植株有S4c、S4d、S6c、N1a、N1b、N1c。

3.2 广藿香变异植株主要化学有效成分

化学诱变是一种可靠的育种方法,已广泛应用于药用植物育种材料的筛选。张秀省等^[24]将长春花愈伤组织经EMS和秋水仙素诱变处理后,获得了生长较快且吲哚生物碱含量较高的新材料。唐晓敏等^[25]利用NaN₃、EMS及秋水仙素等处理广金钱草种子,获得了总黄酮、多糖和夏佛塔苷含量均高于CK的优质变异植株。本研究显示,化学诱变剂对广藿香主要有效成分含量影响较大。变异植株的广藿香酮及百秋季醇含量与CK差异均有统计学意义($P<0.05$)。其中,F1、F2a、F4a、F4b、F4d、F4e、F6e、F8i、

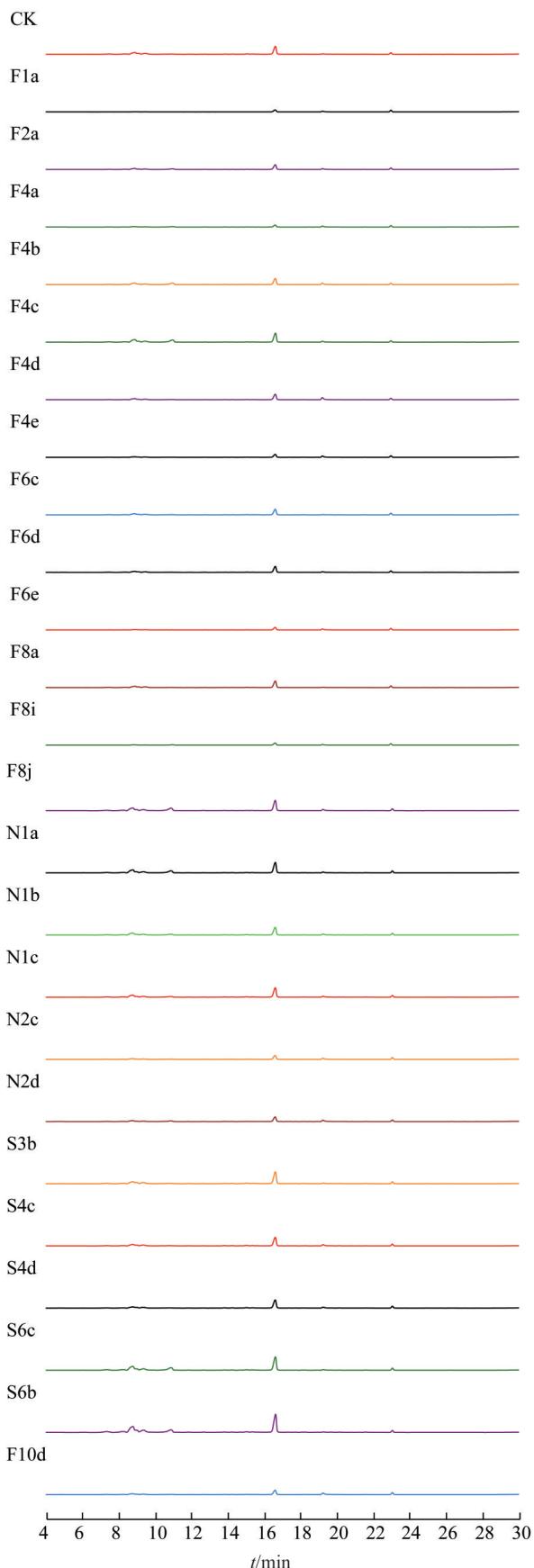


图6 CK及24株广藿香变异植株的色谱图

F10d、N2c、N2d的广藿香酮含量明显升高，且高于百秋季醇，即“醇型”广藿香经化学诱变处理后转变为“酮型”广藿香。此外，有研究表明，“酮型”广藿香在治疗肠道致病菌、缓解胃肠平滑肌痉挛、促进消化及抗腹泻等方面优于“醇型”广藿香，而“醇型”广藿香则在抗炎、抗病毒及抗幽门螺杆菌等方面较好^[26]。因此，在后续的品种选育中，可根据需求对其进行选择。除此之外，F4c、N1a、N1c的广藿香酮及百秋季醇含量均明显升高，F6d、F8j、N1a、N1b、N1c、S3b、S4c、S4d、S6b、S6c的百秋季醇或广藿香酮含量均显著高于CK，这说明在广藿香优良品种选育时，人工化学诱变育种则是一种可靠的手段。

药用植物优良种质资源选育时，在考虑遗传变异程度的同时还应综合评价其药用有效成分含量。综合分析广藿香变异植株在分子水平的变异程度及有效成分含量，最终确定17株性状优良的变异植株。其中，F1、F2a、F4a、F4b、F4d、F4e、F6e、F8i、F10d、N2c、N2d为“酮型”广藿香植株，而N1a、N1b、N1c、S4c、S4d、S6c在分子水平及有效成分含量等方面均表现出优良性状。因此，这17株广藿香变异植株具有优质开发潜能，有待于进一步开展继代培养研究，以获得大量具有稳定遗传性的广藿香优良品种。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2020:46-47.
- [2] 吴卓娜,吴卫刚,张彤,等. 不同产地广藿香化学成分及药理作用研究进展[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2019, 21(6):1227-1231.
- [3] 欧晓华,刘晓莹,李嘉慧,等. 两种化学型广藿香叶显微特征比较[J]. 北方园艺, 2021(3):136-143.
- [4] 谢宜杰,刘晓莹,罗可可,等. 醇型和酮型广藿香DNA甲基化的MSAP分析[J]. 中草药, 2020, 51(20):5293-5301.
- [5] 张英,周光雄. 广藿香的本草考证研究[J]. 中药材, 2015, 38(9):1986-1989.
- [6] 欧阳蒲月,李亚萍,莫小路. 广藿香资源调查、研究进展与发展趋势[J]. 大众科技, 2019, 21(8):55-57.
- [7] 彭波,徐庆国,李海林,等. 农作物化学诱变育种研究进展[J]. 作物研究, 2007, 21(增1):517-519.
- [8] 赵晓潘. 氟乐灵离体诱导半枝莲多倍体的研究[D]. 南京:南京师范大学, 2013.
- [9] 丁银媛. 甜叶菊多倍体诱导及LED光源对其组培苗影响的研究[D]. 合肥:安徽农业大学, 2019.
- [10] CHENG Z H, ZHOU X J, KHAN M A, et al. *In vitro* induction of tetraploid garlic with trifluralin [J]. Genet Mol Res, 2012, 11(3): 2620-2628.
- [11] 赵璘,刘文革,郭金丽,等. 除草剂在植物离体染色体加倍上的应用[J]. 长江蔬菜, 2008(1):30-33.
- [12] 李永平,李丽,梁峥,等. 氟乐灵对萱草多倍体的诱导[J]. 山西农业科学, 2018, 46(12):1997-2000.
- [13] 徐国生. 水稻化学诱变效果的初步研究[J]. 遗传, 1987, 9(2):1-4.
- [14] 李夏. 寒兰离体化学诱变研究[D]. 南昌:南昌大学, 2007.
- [15] 胡贞贞,黄伟展,卢昌华,等. 不同产地广藿香非靶向代谢组学研究[J]. 中药材, 2019, 42(2):271-278.
- [16] 黄月琴. 基于表型性状与 SSR、SRAP 标记的苦瓜种质资源遗传多样性分析[D]. 南昌:江西农业大学, 2015.
- [17] 李嘉惠,欧晓华,邓文静,等. 基于 SRAP 分子标记构建何首乌核心种质库[J]. 广西植物, 2021, 41(11):1920-1930.
- [18] 姚华开,罗英舰,郑元利,等. 基于 SRAP 分子标记的马铃薯品种遗传多样性分析[J]. 安徽农业科学, 2021, 49(15):104-107.
- [19] 李亚利,于铁峰,罗爱玉,等. SRAP 分子标记在茄果类蔬菜航天诱变育种中的应用[J]. 中国农学通报, 2015, 31(28):60-64.
- [20] 高彦辉,毛丽娟,罗爱玉,等. 利用太空诱变自交系育成辣椒新品种航椒 18 号的特征特性研究及 SRAP 分析[J]. 现代农业科技, 2018(9):79-81.
- [21] 唐晓敏,程轩轩,张春荣,等. 广金钱草化学诱变植株表型及 SRAP 遗传差异[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(4):32-37.
- [22] 袁润勤,曲高平,郭媛,等. 甘蓝型油菜 EMS 突变后代材料的分子遗传多样性分析[J]. 西北农业学报, 2017, 26(6):855-864.
- [23] 刘晓莹,李嘉惠,杨钰婷,等. 基于 AFLP 分子标记的广藿香遗传多样性分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(4):152-158.
- [24] 张秀省,张荣涛,郭玉海,等. 长春花不同愈伤组织中吲哚生物碱积累的比较研究[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(12):938-939, 955.
- [25] 唐晓敏,程轩轩,张春荣,等. 广金钱草化学诱变植株产量和质量的研究[J]. 中药材, 2018, 41(5):1035-1039.
- [26] 罗集鹏,冯毅凡,何冰,等. 广藿香的道地性研究[J]. 中药材, 2005, 28(12):1121-1125.

(收稿日期: 2022-08-15 编辑: 戴玮)