

文章编号: 1674-7054(2017)03-0277-07

广藿香⁶⁰Co- γ 诱变体植株遗传多样性的 ISSR 分析

姚宇¹ 李娟玲¹ 李碧英¹ 罗志平² 李丽辉² 李文革²

(1. 海南大学 热带农林学院, 海口 570228; 2. 湖南省核农学与航天育种研究所, 长沙 421125)

摘要: 从广藿香的同一大田植株上取外植体构建了一批无菌材料。将这批无菌材料分别经过 0, 45, 60, 75, 90 Gy 的⁶⁰Co- γ 射线辐照诱变处理, 获得了 172 份 Co- γ 射线诱变体材料和 1 份对照无菌材料(CK; 0 Gy)。分别提取这 173 份无菌材料的基因组 DNA, 用 14 条 ISSR 有效引物对 173 份种质材料的基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 共获得 297 条扩增产物, 其中多态性条带为 68 条, 诱变材料的多态位点比率 PPB 为 43.13%, 观测等位基因数 Na = 1.431 3, 有效等位基因数 Ne = 1.257 3, Nei's 基因多样性 H = 0.146 5, Shannon 信息指数 I = 0.217 5。173 份供试材料之间遗传关系系统树由 UPGMA 法根据所得遗传相似系数矩阵构建。系统树图表明, 当 GS (遗传相似系数) 取值 0.09 < GS < 0.42 时, 可以把供试的 173 份材料划分为 2 个类群: 即 I 类群和对照(CK); 当 GS = 0.44 时, 可把 I 类群分为 2 个亚类群, 即 II 类群和 90 Gy-43 号材料; 当 GS 取值 0.46 < GS < 0.48 时, 又可把 II 类群分为 2 支, 即 III 类群和 75 Gy-13 号材料。虽然有部分不同辐射剂量处理的诱变植株聚类在一起, 但是总体上是相同辐射剂量处理组的诱变植株聚为一类。结果表明, 广藿香无菌材料经用⁶⁰Co- γ 射线辐照诱变后发生变异频率较大, 为此, ⁶⁰Co- γ 射线辐照诱变可作为广藿香种质创新的一种有效手段。

关键词: 广藿香; ⁶⁰Co- γ 射线诱变; 遗传多样性; ISSR 分析

中图分类号: Q 943

文献标志码: A

DOI: 10.15886/j.cnki.rdswwb.2017.03.005

广藿香 (*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth) 是我国重要的常用中药^[1-18]之一, 经菲律宾、马来西亚和印度等国家传入我国。由于气温较原产地低, 广藿香在我国产区栽培罕见开花, 生产上一直依赖扦插繁殖。长期栽培过程中, 病原体通过无性繁殖持续传递, 不仅使品种发生退化, 病虫害亦较有性繁殖方式的严重。更为严重的是, 由于广藿香在我国产区不能正常开花结实, 故在我国无法通过正常的有性途径进行种质保存和种质创新, 导致我国的广藿香种质资源十分稀缺。本研究以广藿香无菌苗为实验材料, 拟采用⁶⁰Co- γ 射线对无菌材料进行诱变, 进而采用 ISSR 分子标记技术分析突变材料的遗传多样性, 通过对突变体材料与外植体原始供体之间, 以及不同突变体材料个体之间的遗传差异的研究, 明确⁶⁰Co- γ 射线对于广藿香无菌苗的诱变条件与诱变效果, 并从诱变后的材料中筛选出若干变异程度较大的突变体材料作为新型种质材料保存, 以供后来研究者开展广藿香育种工作。

1 材料与方法

1.1 材料 172 份分别经过 45, 60, 75, 90 Gy 的⁶⁰Co- γ 射线辐照诱变处理的广藿香无菌种质材料和 1 份未经⁶⁰Co- γ 射线辐照诱变处理的无菌对照材料(CK; 0 Gy)。所有的无菌供试材料其外植体均来自同一盆栽植株, 即外植体原始供体植株(CK)。

1.2 DNA 的提取 经过⁶⁰Co- γ 射线辐照诱变后, 每份无菌材料均转接到“1/2 MS + 0.25 mg·L⁻¹ IBA”生根

收稿日期: 2016-12-23

修回日期: 2017-07-04

基金项目: 海南省自然科学基金资助项目(312072)

作者简介: 姚宇(1988-), 女, 辽宁伊春人, 海南大学农学院 2011 级野生动植物保护与利用专业硕士研究生。

通信作者: 李碧英(1967-), 女, 四川成都人, 讲师, 研究方向: 观赏园艺及休闲农业, E-mail: 404281096@qq.com

培养基上,置于培养室中培养 3 个月。然后从每份供试材料中取嫩叶 3~5 片,采用改良 CTAB 法^[19]提取 DNA。具体方法:使用 100 μL ddH₂O 溶解提取 DNA,并在紫外分光光度计下测定其浓度和纯度;使用浓度为 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测;最后置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 的冰柜中保存备用。

1.3 PCR 扩增反应 用笔者在实验室优化的 ISSR 反应体系和扩增程序^[20]在 icycler™ Thermal Cycler 型 PCR 仪上进行扩增反应。反应体系组成: DNA 模板 40 ng,引物 0.4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,10 $\times$ 反应 buffer 2.5 μL ,TaqDNA 聚合酶 2.0 U,2.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl₂,200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTPs,最后用无菌超纯水补足至 25 μL 。ISSR-PCR 扩增程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,然后按 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s,52 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s,进行 40 个循环,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min;4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存。

1.4 扩增产物的检测 取扩增产物 10 μL 和 2 μL 上样缓冲液(含 40% 蔗糖、0.25% 溴酚蓝)混匀,点样于 1.5% 琼脂糖凝胶(含 0.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ EB)的上样孔中,以 Trans2K Plus DNA Marker 作为对照相对分子质量标准,在 0.5 $\times$ TBE 缓冲液中电压 5 V $\cdot\text{cm}^{-1}$ 电泳 1.5~2.5 h,UVP 型凝胶成像分析系统下照相,记录,检验并分析扩增结果。

1.5 诱变植株的 ISSR 遗传多样性分析 用已筛选的 14 条 ISSR-PCR 引物分别对材料(172 份⁶⁰Co- γ 射线辐照诱变植株的基因组 DNA 与 1 份原始供体广藿香植株 DNA)进行 ISSR-PCR 扩增。

1.6 PCR 扩增谱带的统计和分析 将电泳图谱上清晰且可重复出现的条带记为“1”,同一位置没有条带记为“0”,并经此生成 0 和 1 原始矩阵。统计每个引物扩增出的总带数和其中的多态性带数,计算多态位点化率(Percentage of polymorphic bands,PPB), $PPB = \text{多态位点数} / \text{位点总数}$ 。将整理好的数据输入到 POPGENE Version 1.32 软件,对⁶⁰Co- γ 射线辐照诱变后广藿香植株的多态位点比率(PPB),观测等位基因数(Observed number of alleles, N_a),有效等位基因数(Effective number of alleles, N_e),Nei's 基因多样性指数(Nei's gene diversity, H)和 Shannon 信息指数(Shannon's information index, I)进行数据分析,使用 SIMQUAL 程序(NTSYS-PC(2.02j) 软件)计算 Jaccard 遗传相似系数(genetic similarity,GS),最后使用 SAHN 程序和 UPGMA(unweighted pair group mean average)方法(NTSYS-PC(2.02j) 软件)进行聚类分析,通过 Tree plot 模块生成系统树。

2 结果与分析

2.1 DNA 质量检测结果 采用改良的 CTAB 法提取的广藿香 DNA 基本无 RNA 等杂质,无降解现象(图 1)。采用 Eppendorf BioPhotometer plus 核酸蛋白测定仪测得 DNA 的 OD_{260}/OD_{280} 值均在 1.80 左右。

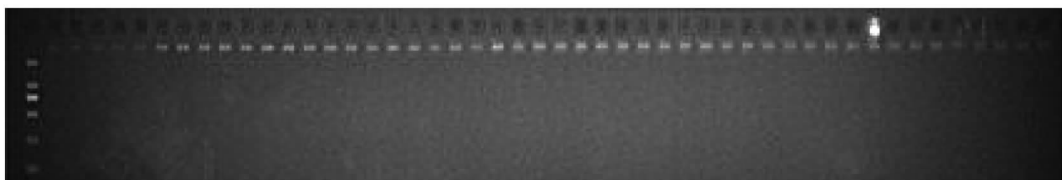


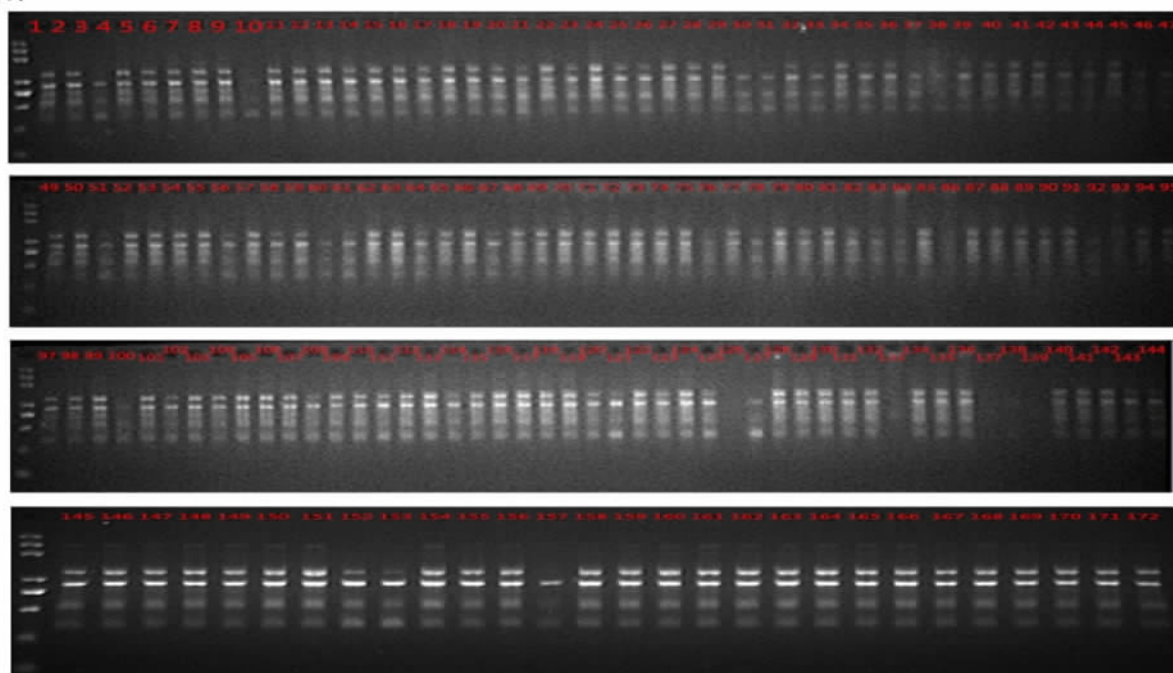
图 1 部分⁶⁰Co- γ 射线辐照诱变材料基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测结果

Fig. 1 The result of agarose gel electrophoresis on genomic DNA of some mutant materials of *Pogostemon cablin* induced by ⁶⁰Co- γ ray
M: λ DNA/HindIII Markers

2.2 ⁶⁰Co- γ 射线辐照诱变体植株 ISSR-PCR 遗传多样性分析

2.2.1 ⁶⁰Co- γ 射线辐照诱变植株 ISSR 扩增结果 用 14 条 ISSR 有效引物对 172 份⁶⁰Co- γ 射线辐照诱变后种质材料的基因组 DNA 进行 PCR 扩增,均能扩增出清晰可记录的条带,条带片断在 250~2 000 bp 之间。其中,引物 UBC-823 和引物 UBC-808 的 ISSR 扩增图谱见图 2。用筛选出的 14 条 ISSR 有效引物对未经⁶⁰Co- γ 射线诱变的对照材料(CK)的基因组 DNA 进行 PCR 扩增,均能扩增出清晰可记录的条带,条带片断在 250~2 000 bp 之间(图 3)。

引物 UBC-823



引物 UBC-808

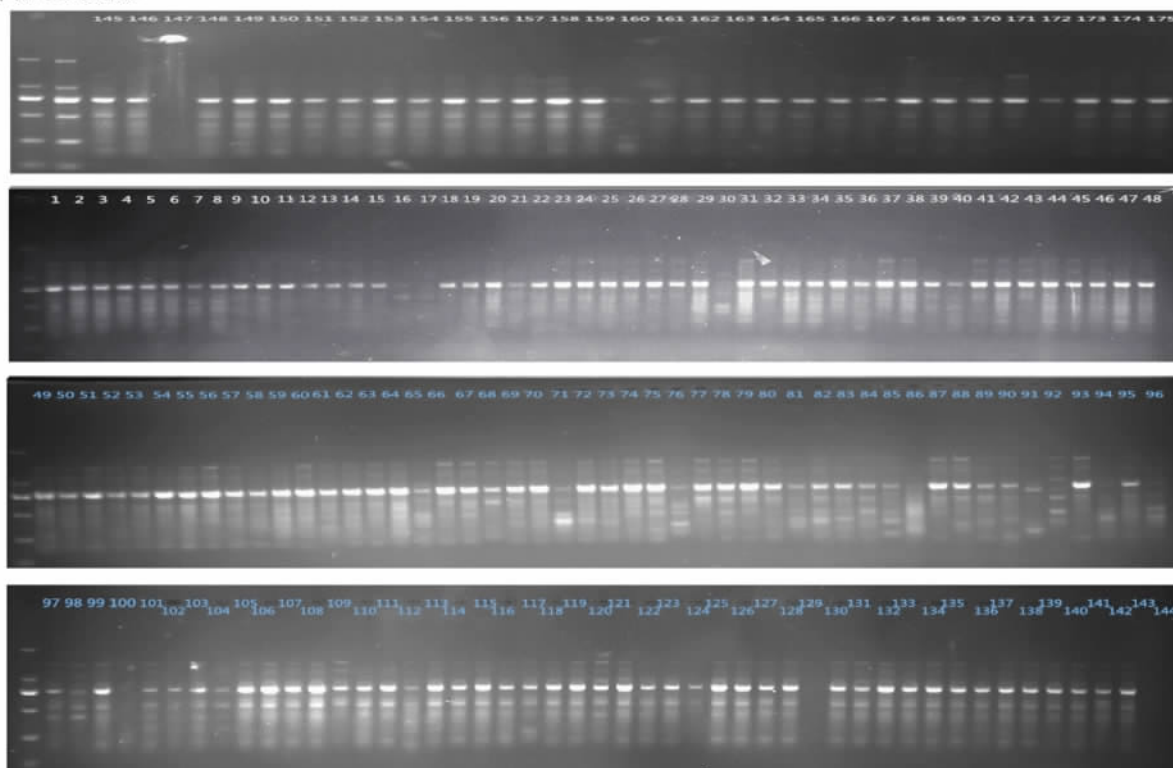


图2 引物 UBC-823 和 UBC-808 的扩增结果

Fig.2 Amplification of Primers UBC-823 and UBC-808

2.2.2 ⁶⁰Co- γ 射线辐照诱变植株 ISSR 遗传多样性结果 对 14 条有效引物的扩增结果进行整理,利用 POPGENE1.32 软件对供试的⁶⁰Co- γ 射线辐照诱变材料进行遗传参数分析,结果见表 1。由表 1 可见,在所有的供试材料中,共获得 297 条扩增产物,其中多态性条带 68 条,诱变材料的多态位点比率 PPB 为 43.13%。观

测等位基因数 $N_a = 1.431\ 3$, 有效等位基因数 $N_e = 1.257\ 3$, Nei's 基因多样性 $H = 0.146\ 5$, Shannon 信息指数 $I = 0.217\ 5$ 。

表 1 $^{60}\text{Co-}\gamma$ 射线辐照诱变植株遗传多样性指数
Tab. 1 Genetic diversity indexes of *Pogostemon cablin* induced by $^{60}\text{Co-}\gamma$

处理剂量 Treatment doses	个体数 Individuals	多态位点比率 PPB /%	观测等位 基因数(N_a)	有效等位 基因数(N_e)	Nei' 基因多 样性(H)	Shannon 信息指数(I)
45Gy	13	30.77	1.307 7	1.223 0	0.123 0	0.178 4
60Gy	27	32.97	1.329 7	1.215 6	0.121 5	0.178 6
75Gy	19	42.86	1.428 6	1.229 8	0.135 2	0.205 1
90Gy	113	65.93	1.659 3	1.360 9	0.206 4	0.307 8
处理平均水平 Average treatment level		43.13	1.431 3	1.257 3	0.146 5	0.217 5
处理间总水平 Total Treatment level	172	71.43	1.714 3	1.350 5	0.204 9	0.308 4

注(Note): PPB: Percentage of polymorphic bands; N_a : Number of alleles observed; N_e : Effective number of alleles; H : Nei's gene diversity; I : Shannon's information index

采用作者所在实验室筛选出的 14 个有引物对 172 份 $^{60}\text{Co-}\gamma$ 射线辐照诱变植株材料和 1 份原始供体对诱变体植株材料(CK)进行 PCR 扩增, 计算其遗传相似系数。该 173 份供试材料之间遗传关系系统树图按 UPGMA 法根据所得遗传相似系数矩阵构建(图 4)。如图 4 所示, 当 GS(遗传相似系数)值取 $0.09 < GS < 0.42$ 时, 可以把供试的 173 份广藿香材料划分为 2 个类群, 即类群 I 和对照材料(CK); 当 $GS = 0.44$ 时, 又可以把类群 I 分为 2 个亚类群, 即类群 II 和 90 Gy-43 号材料; 当 GS 值取 $0.46 < GS < 0.48$ 时, 又可以把类群 II 分为 2 支, 即类群 III 和 75 Gy-13 号材料。

综上所述, 虽然有部分不同辐射剂量处理的诱变植株聚类在一起, 但是总体上是相同辐射剂量处理组的诱变植株聚为一类。聚类分析结果表明, $^{60}\text{Co-}\gamma$ 射线辐照诱变后所发生的变异频率较大, 这种现象可能与 $^{60}\text{Co-}\gamma$ 射线辐照诱变的突变机理有关。 $^{60}\text{Co-}\gamma$ 射线辐照诱变所诱发的 DNA 突变是以 DNA 分子上的点突变为主。显然, 经过 $^{60}\text{Co-}\gamma$ 射线辐照诱变后, 大部分广藿香植株都与对照植株之间均存在一定的遗传距离, 即 GS 较小, 遗传距离较大。且如图 4 所示, 大部分广藿香 $^{60}\text{Co-}\gamma$ 射线辐照诱变后的植株并没有和 CK 聚类在一起, 而是与 CK 产生了一定的遗传距离。大体可以分成 I 和 II 类群, I 类群又分为 III 和 IV 两个亚类群, 其中 III 亚类群主要包含 A 和 B 组, A 组中的 E 亚组含有大部分的 45 Gy 处理组植株和 1 株 60Gy-7 植株, 剩余的 45 Gy 处理组植株以及几乎所有的 60 Gy 处理组和大多数 75 Gy 处理组植株都归为 A 组中的 F 亚组; 大多数 90 Gy 处理组植株归为 I 类群 III 亚类群 B 组、IV 亚类群和 II 类群, 其中 I 类群 III 亚类群 B 组还包含 75 Gy-9、10、12、14、15 和 17 诱变植株, 而 IV 亚类群和 II 类群所包含的诱变植株都是 90Gy 处理组植株。此外, 75 Gy-13 与 I 类群的诱变植株, 90 Gy-13 与 I 类群和 II 类群的诱变植株遗传距离较远, 分别单独聚为一类。

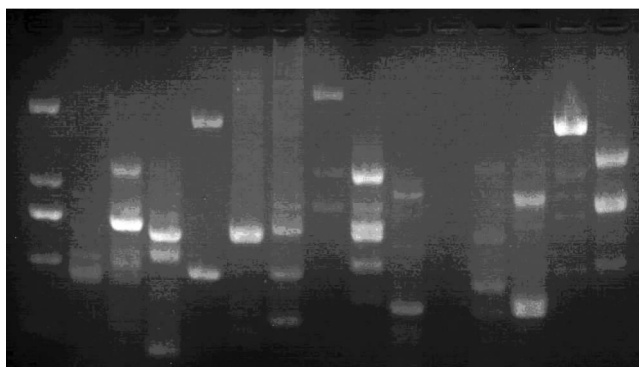


图 3 14 条有效的 ISSR 引物对植株 CK 的扩增结果
Fig.3 Amplification of the DNA of the control plant (CK) by using the 14 effective ISSR primers

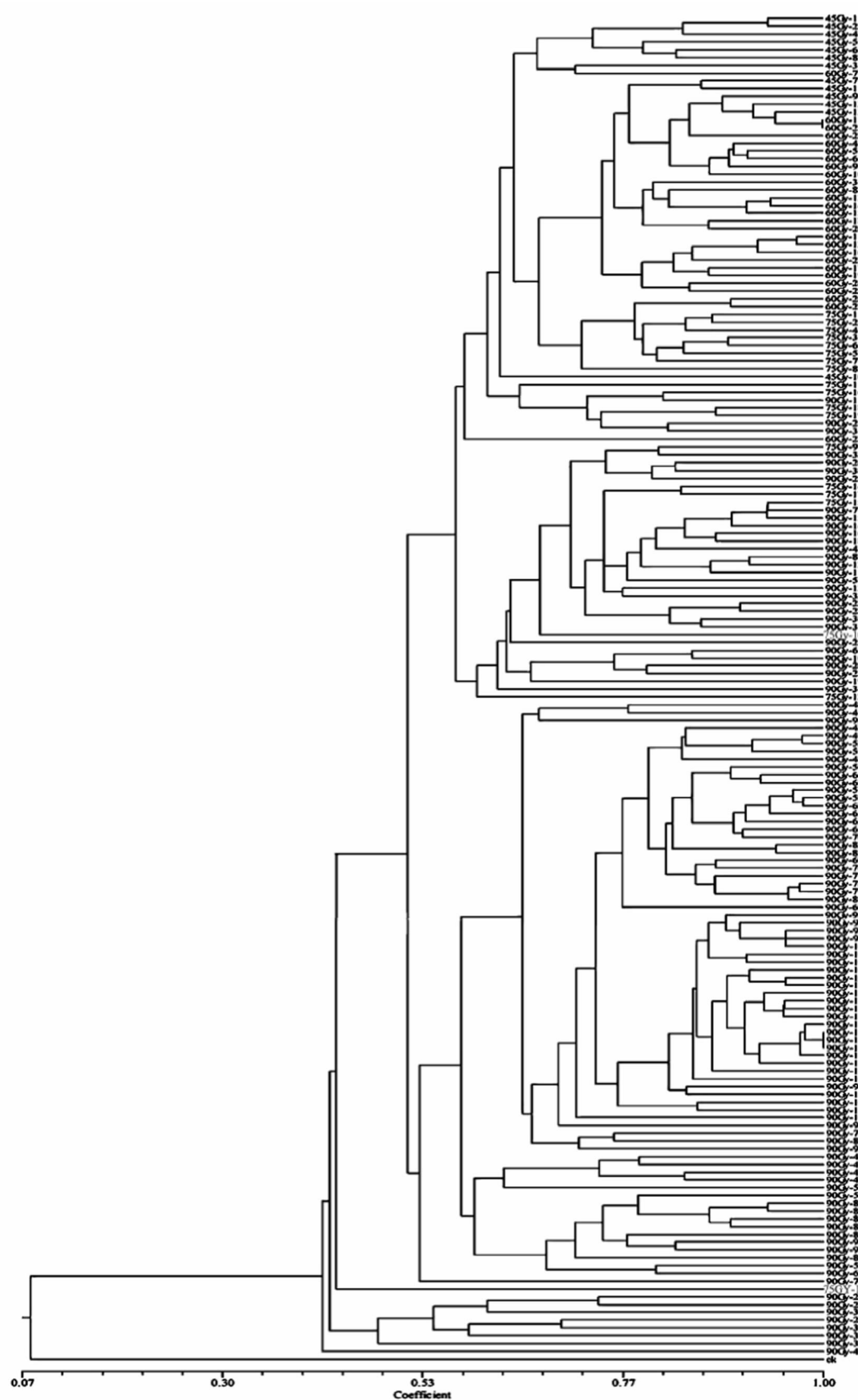


图 4 172 份广藿香诱变株和 1 份外植体原始供体株 CK 的 ISSR 聚类分析结果

Fig .4 ISSR cluster analysis diagram for 172 patchouli mutagenic plants and their explant donor plant (CK)

3 讨 论

本研究中以广藿香无菌苗为实验材料,采用 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 射线对无菌材料进行诱变,进而采用 ISSR 分子标记技术分析突变材料的遗传多样性,通过对突变体材料与外植体原始供体之间,以及不同突变体材料个体之间的遗传差异的研究,明确了 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 射线对于广藿香无菌苗的诱变条件与诱变效果。由于 173 份供试材料最初均来自外植体原始供体广藿香植株,从聚类树状图中可以看出 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 射线辐照诱变后的突变体植株与对照株(外植体供体植株;CK)不仅产生了一定的遗传距离,且遗传距离很大,因此,根据这一点可以推测出经 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 射线辐照之后,供试材料发生了 DNA 的突变,且该突变可以用 ISSR 检测出;否则,所有供试的 173 份材料其遗传距离应该为 0,即彼此互为重复材料。本实验结果表明,广藿香无菌材料经 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 射线辐照诱变后所发生的变异频率较大; $^{60}\text{Co}-\gamma$ 射线辐照诱变可以作为广藿香种质创新的一种有效手段。通过 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 射线诱变与植物组织培养相结合的途径,可以在较短时间内成功地创造出遗传差异较大的诱变体植株。这些诱变体材料经炼苗移栽后,可以定植到大田用于构建一个广藿香诱变体种质资源圃,为后续的广藿香新品种选育和分子生物学研究提供遗传多样性比较丰富的育种材料和分子生物学实验材料。在育种实验中,一旦从广藿香的 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 射线诱变体材料中发现了某一综合性状良好的育种材料(无论是纯合的或杂合的)均可以通过无性繁殖手段(组织培养或扦插)迅速扩大该优异材料的群体规模。由于在我国的气候条件下只能通过扦插育苗批量生产广藿香种苗,故一个来自 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 射线诱变的广藿香优良品系,只要通过了品比和区试等育种程序,即可直接在生产上大面积推广应用。

参考文献:

- [1] 中国医学科学院药用植物资源开发研究所. 中药志第四册[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 128.
- [2] 何国振, 李锦坤, 高伟, 等. 广东省广藿香种植业发展策略[J]. 中国农学通报, 2012, 31(9): 79~82.
- [3] 黄崇坚. 广藿香的栽培技术. 中国热带农业[J], 2011, 1(13): 51~54.
- [4] 李薇, 潘超美, 徐良, 等. 不同产地广藿香特征的观测和比较[J]. 中药材, 2002, 25(7): 463~465.
- [5] 徐颂军, 王晓峰, 徐祥浩, 等. 药用植物广藿香的品种分类探讨[J]. 华南师范大学学报(自然科学版), 2003(1): 82~86.
- [6] 杨得坡, Chaumont Jean-Pierre, Millet Jolle, 等. 藿香和广藿香挥发油对皮肤癣菌和条件致病真菌的抑制作用[J]. 中国药学杂志, 2000, 35(1): 9~11.
- [7] 刘琥琥, 罗集鹏, 赖沛炼, 等. 广东高要与吴川产广藿香提取物对肠道致病菌抗菌作用的比较研究[J]. 中药材, 1999, 22(8): 408~410.
- [8] 刘爱如, 于宗渊, 吕丽莉, 等. 广藿香挥发油对抗青蒿酯钠伯氏疟原虫的选择性抗疟作用[J]. 中国中西医结合杂志, 2000(51): 126~127.
- [9] 刘爱如, 于宗渊, 吕丽莉, 等. 广藿香挥发油对青蒿酯钠抗伯氏疟原虫的增效作用和对抗青蒿酯钠伯氏疟原虫的逆转抗性作用[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2000, 18(2): 76~78.
- [10] 赵书策, 贾强, 廖富林. 广藿香提取物的抗炎、镇痛药理研究[J]. 中成药, 2007, 29(2): 285~287.
- [11] 赵书策, 贾强, 廖富林, 等. 广藿香提取物的止咳、化痰、平喘药理研究[J]. 中成药, 2008, 30(3): 449~450.
- [12] 刘尧, 毛羽. 广藿香挥发油止咳化痰药理实验的研究[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(8): 1920~1921.
- [13] 刘玮锦, 索娟, 黄晓丹, 等. 藿胆丸中广藿香治疗鼻炎有效部位的研究[J]. 中药材, 2008, 31(12): 1865~1867.
- [14] 陈小夏, 何冰, 李显奇, 等. 广藿香胃肠道药理作用[J]. 中药材, 1998, 21(9): 462~466.
- [15] 何冰, 陈小夏, 李显奇, 等. 高要和吴川产藿香对消化系统的作用比较[J]. 中药材, 1999, 22(4): 201~203.
- [16] 何冰, 陈小夏, 罗集鹏. 广藿香去油部分的 5 种不同极性提取物对胃肠道的影响[J]. 中药材, 2001, 24(6): 422~423.
- [17] 杨得坡. 藿香和广藿香挥发油的抗皮肤细菌活性与化学成分的研究[J]. 微生物学杂志, 1998, 18(4): 1~4.
- [18] 苏镜娱, 张广文, 李核, 等. 广藿香精油化学成分分析与抗菌活性研究(I) [J]. 中草药, 2001, 32(3): 204~205.
- [19] 李娟玲, 刘国民, 贾媛, 等. 一种高效提取鹧鸪茶基因组 DNA 的方法[J]. 中国农学通报, 2010, 26(8): 69~73.
- [20] 曹嵩晓, 李娟玲, 刘国民, 等. 利用单因子和正交设计双重实验方法优化广藿香 ISSR-PCR 实验体系. 热带生物学报, 2011(1): 12~15.

ISSR Analysis of Plant Genetic Diversity of ⁶⁰Co- γ Induced Mutants of *Pogostemon cablin*

YAO Yu¹, LI Juanling¹, LI Biying¹, LUO Zhiping², LI Lihui², LI Wenge²

(1. College of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou, Hainan Province 570228, China;

2. Hunan Institute of Nuclear Agricultural Sciences and Space Breeding, Changsha, Hunan Province 410125, China)

Abstract: A number of germfree materials were obtained from explants of the same field plant of *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. These germfree materials were irradiated by ⁶⁰Co- γ ray irradiation at a respective dose of 0, 45, 60, 75 or 90 Gy, from which 172 pieces of ⁶⁰Co- γ ray mutant material and 1 piece of germfree control material (CK; 0 Gy) were produced. The genomic DNAs of 173 germfree materials were extracted and amplified by using PCR with 14 ISSR primers. A total of 297 amplified products were produced, of which there were 68 polymorphic bands, the percentage of polymorphic bands (PPB) was 43.13%, the observed number of alleles (NA) was 1.431 3, the effective number of alleles (Ne) was 1.257 3, the Nei's gene diversity (H) was 0.146 5, and Shannon index was 0.217 5. According to the obtained genetic similarity coefficient matrix, a phylogenetic tree showing genetic relationships among the 173 materials tested was constructed by UPGMA. This phylogenetic tree diagram showed that at the genetic similarity coefficient (GS) range of 0.09 < GS < 0.42 the 173 materials could be divided into two groups: Group I and CK, that at the GS of 0.44, the Group I could be divided into two subgroups: Group II and material 90 Gy-34, and that at the range of 0.46 < GS < 0.48, the Group II could be divided into two branches: Group III and material 75 Gy-13. Although some of the mutagenic plants induced by radiation at different doses were clustered together, the mutant plants induced at the same radiation dose were generally clustered into the same group. The results showed that ⁶⁰Co- γ -ray irradiation had significant mutagenic effect on the mutants of *P. cablin* (Blanco) Benth. Mutation with ⁶⁰Co- γ ray could be used as an effective method for germplasm innovation of *P. cablin* (Blanco) Benth.

Keywords: *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth; ⁶⁰Co- γ ray irradiation; genetic diversity; ISSR analysis