

· 研究报告 ·

## $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ 射线辐照种子对牛至形态与挥发性成分的影响

闫一皓<sup>1,2</sup>, 王頔<sup>1\*</sup>, 李静一<sup>1</sup>, 张文颖<sup>1</sup>, 郝渊鹏<sup>1</sup>, 夏菲<sup>1</sup>, 李慧<sup>1</sup>, 白红彤<sup>1</sup>, 石雷<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>中国科学院植物研究所, 北方资源植物重点实验室/北京植物园, 北京 100093; <sup>2</sup>中国科学院大学, 北京 100049

**摘要** 牛至精油中的主要成分香芹酚和百里香酚具有较强的抑菌活性和替代抗生素的良好潜力。为了筛选有价值的遗传变异, 构建了牛至(*Origanum vulgare*)的 $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ 射线育种体系, 利用固相微萃取联合气相色谱-质谱方法进行挥发性成分测定, 并通过主成分分析和层次聚类等多元分析法, 深入探讨 $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ 射线对牛至M<sub>1</sub>代形态特征、腺毛密度和腺毛大小以及挥发性成分的影响。结果表明, 牛至种子的半致死剂量为16.39 Gy; 辐照M<sub>1</sub>代植株的株高、茎粗、分枝数、叶长和叶宽均发生变化, 筛选到多株形态突变体; 同时, 腺毛密度和腺毛大小发生多种变化, 从163株存活株中筛选出25株腺毛密度与大小均显著增大的单株;  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ 射线处理对牛至挥发性成分的种类影响相对较小, 主要影响挥发性成分的含量, 并可诱导5种化学型, 即香芹酚型、百里香酚型、 $\gamma$ -萜品烯型、 $\beta$ -石竹烯型和大根香叶烯型; 最终筛选获得6株香芹酚和百里香酚含量升高的突变单株。研究证实了 $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ 射线辐照可作为牛至育种的一种有效诱变手段, 适宜辐照剂量为20 Gy。研究为牛至优良种质资源的选育提供了基础数据和新途径。

**关键词** 牛至, 辐照育种,  $\gamma$ 射线, 香芹酚, 百里香酚, 挥发性成分

闫一皓, 王頔, 李静一, 张文颖, 郝渊鹏, 夏菲, 李慧, 白红彤, 石雷 (2021).  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ 射线辐照种子对牛至形态与挥发性成分的影响. 植物学报 56, 533–543.

牛至(*Origanum vulgare*)是唇形科植物, 原产于欧洲、非洲大陆北部和温带亚洲, 主要分布于地中海地区, 特别是土耳其(Bouyahya et al., 2020; Arabaci et al., 2021)。作为传统的香料和药用植物, 牛至可用于预防流感, 治疗发热、呕吐、急性胃肠炎和消化不良等(Oniga et al., 2018)。牛至地上部分全株可提取精油, 其挥发油在茎、叶和花(萼片、花瓣)表面的盾状腺毛中合成和分泌。牛至盾状腺毛的头部由8个分泌细胞和1个扩大的分泌腔组成, 与精油产量和品质密切相关(Fikry et al., 2019)。牛至精油是多种化合物的混合物, 其主要成分为单萜和倍半萜, 已被证明具有抗氧化、抑菌、抗炎和降血脂等多种功效(Elshafie et al., 2017; Morshedloo et al., 2018)。近年来, 在食品和制药工业中使用天然精油作为抗菌剂成为研究热点(Sharifi-Rad et al., 2018; Rajput et al., 2018)。

牛至精油作为天然替抗产品, 其抗菌活性主要来自精油中的单萜类成分香芹酚和百里香酚, 两者是一对同分异构体, 均可强烈抑制革兰氏阳性菌和阴性菌。其中, 香芹酚的抑菌活性显著高于牛至精油中的其它化合物(郝渊鹏等, 2020)。提高牛至挥发性成分中香芹酚和/或百里香酚的含量, 可通过调控其代谢途径, 也可通过品种改良来实现。

目前, 对牛至的研究集中在挥发油成分分析、功能评价以及活性成分的代谢途径阐释等方面, 育种研究相对较少, 仅有少量研究用实生选种和自然杂交后代中筛选的方式进行育种(Sarrou et al., 2017)。牛至是多年生植物, 生长速度慢, 选育周期长。辐照诱变具有快速产生广泛突变谱、高效拓宽物种遗传多样性以及获得优质变异性状等优势, 在植物新品种培育与改良中发挥重要作用(Oladosu et al., 2016)。

收稿日期: 2021-01-18; 接受日期: 2021-04-19

基金项目: 中国科学院A类战略性先导科技专项(No.XDA26040306)和国家科技资源共享服务平台“国家重要野生植物种质资源库”(No.ZWGX2004)

\* 通讯作者。E-mail: diwang@ibcas.ac.cn; shilei@ibcas.ac.cn

近60年,全世界已产生3 000多种植物突变品种,其中80%由电离辐射诱变。自20世纪50年代后期我国开展诱变育种以来,已培育出水稻(*Oryza sativa*)、小麦(*Triticum aestivum*)、玉米(*Zea mays*)、番茄(*Lycopersicon esculentum*)和花生(*Arachis hypogaea*)等诱变品种,其中46个物种的810个突变品种已被批准用于商业化生产(Esnault et al., 2010)。 $\gamma$ 射线是应用最广泛的辐照源,通常以 $^{60}\text{Co}$ 源提供。对芳香植物和药用植物的研究表明,用 $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ 射线辐射植物材料可以诱变产生观赏期长、色彩丰富、株型美观、抗性强的植物新品种(王晶等, 2003; Jan et al., 2012; 余蓉培等, 2015),也对植物次生代谢途径产生影响,使萜类、酚类和生物碱这3类次生代谢产物发生变化,而引起相关性状的改变。对于一些芳香和药用植物,适宜剂量的辐照具有提高香气成分或药用成分含量的潜力(Koseki et al., 2002; Vardhan and Shukla, 2017)。目前,芳香植物牛至的 $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ 射线诱变育种尚未见报道。

本研究以 $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ 射线为辐照源,对牛至种子进行不同剂量的辐照诱变,分析 $M_1$ 代植株的诱变效应,确定半致死剂量;并探讨射线辐照对牛至形态特征、腺毛密度与大小以及挥发性成分的影响,以期筛选出主要抑菌活性成分香芹酚和/或百里香酚含量升高的突变株系,为牛至诱变育种提供基础数据和新途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料及处理

供试材料为商业购买的牛至(*Origanum vulgare* L.)种子,籽粒饱满。实验于中国科学院植物研究所苗圃进行。

$^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ 射线辐照处理:钴源由北京大学化学与分子工程学院钴源实验室提供,实验辐射剂量设置为10、20、30和40 Gy,剂量率均为 $5\text{ Gy}\cdot\text{min}^{-1}$ ,以0 Gy作为对照,每个处理选取40粒籽粒饱满的种子。实验设3次重复。处理后置于双层湿润滤纸催芽,从第1粒种子发芽开始,每天统计发芽的种子数,直至发芽结束。之后取出种子播种于32孔穴盘,15天后统计成活率。1个月后将幼苗移栽到苗圃自然生长。5个月后进行成熟株开展形态特征和品质成分研究。

### 1.2 测定方法

#### 1.2.1 成苗形态指标测定

从各处理中随机选取20株植株,用游标卡尺测定株高、茎粗、叶长及叶宽。每个处理设3个重复。通过相机和显微镜拍照,记录形态变异较大的单株。

#### 1.2.2 腺毛密度和腺毛大小观测

选取枝条顶部向下第2–3片成熟叶片,每株选取3片。在体视镜(尼康SMZ1000)和荧光显微镜(Leica DM 5000B)下观察鲜叶。随机选取3个显微镜视野,对近轴端和远轴端叶片的腺毛进行图像采集。采用ImageJ软件统计腺毛密度和大小,腺毛密度为3个视野中单位面积腺毛数量的平均值,腺毛大小为30个腺毛横截面积的平均值。

#### 1.2.3 挥发性成分测定

采用顶空固相微萃取联合气相色谱-质谱(solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry, SPME-GC-MS)法进行挥发性成分测定。依据咎俊峰等(2013)的方案并稍作改进。使用前先将SPME的萃取纤维头在气相色谱的进样口老化10分钟,老化温度为 $250^\circ\text{C}$ ,载气体积流量为 $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。取0.15 g叶片,置于5 mL样品瓶中,盖上盖子,插入 $65\text{ }\mu\text{m}$  PDMS-DVB 萃取纤维头,于 $50^\circ\text{C}$ 顶空取样30分钟,取出后立即插入色谱仪进样口(温度 $250^\circ\text{C}$ )脱附5分钟,加入 $10\text{ }\mu\text{L}$   $3\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  3-辛醇作为内标,不分流。色谱柱为HP-5MS毛细管色谱柱( $30\text{ m}\times 0.25\text{ mm}\times 0.25\text{ }\mu\text{m}$ )。色谱条件:载气He的流量为 $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ;色谱柱初始温度 $60^\circ\text{C}$ ,保持5分钟,以每分钟 $5^\circ\text{C}$ 升温至 $180^\circ\text{C}$ ,再以每分钟 $20^\circ\text{C}$ 升至 $260^\circ\text{C}$ ,保温7分钟;进样口温度 $250^\circ\text{C}$ ,检测温度 $280^\circ\text{C}$ ,前2分钟不分流,后38分钟分流比为20:1。质谱条件:EI源, EI离子源温度 $250^\circ\text{C}$ ,质量范围55–550 amu。将色谱级正构烷烃样品(C7–C40)各取等量混合后,按上述GC-MS条件进行色谱分析,测定正构烷烃的保留时间,再在完全相同的条件下对样品进行分析,测定各组分的保留时间,计算出各组分的Kovats保留指数。采用NIST147质谱库检索,以标准品保留时间或Kovats保留指数对挥发物组分进行定性分析。用内标法定量。

### 1.3 数据分析

使用 SPSS 19.0 软件的单因素方差分析 (OneWay-ANOVA) 对实验数据进行差异显著性检验 ( $P=0.05$ ), 并进行显著性水平为 0.05 的多重比较, 数据取平均值  $\pm$  标准差。对每个剂量处理的单株叶片进行腺毛密度和腺毛大小的聚类热图分析, 采用主成分分析 (principal component analysis, PCA) 法分析辐照变异株的挥发性成分在第 1 和 2 主成分上得分数的差异。采用独立样本  $t$ -test 分析挥发性成分变异单株香芹酚与百里香酚含量差异。在主成分分析之前, 先将挥发物各组分的相对释放量标准化、 $\lg(X+0.000\ 01)$  转化和中心化。采用最短距离法对各处理在第 1 和 2 主成分的得分按两主成分各自的贡献率进行层次聚类分析 (hierarchical cluster analysis, HCA)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ 射线辐照对种子萌发率和存活率的影响

对照组种子播种 2 天后开始萌发, 随后萌发率逐渐上

升, 6 天后, 萌发率达 86.67%。40 Gy 辐照后的种子在各时间点上的萌发率均低于对照, 6 天后种子萌发率为 70% (图 1A)。对第 6 天胚根长度的统计结果表明, 辐照显著抑制胚根的生长 (图 1B), 对照组萌发 6 天后胚根长度达 1.51 cm, 40 Gy 辐照处理组仅为 0.43 cm。随着辐照剂量的增加, 种苗存活率显著下降 (图 1C)。各剂量处理组存活率分别为 51.67%、50.00%、35.00% 和 20.00%, 存活株数为 163 株。上述结果表明,  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$  射线对牛至种子萌发率的影响小于对牛至种苗存活率的影响。将辐射剂量 ( $x$ ) 与相应的致死率 ( $y$ ) 进行回归分析 (图 1D), 得到回归方程  $y=1.200x+30.33$ , 令  $y=50$  时, 计算得到牛至种子辐射半致死剂量 ( $\text{LD}_{50}$ ) 为 16.39 Gy。

### 2.2 $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ 射线辐照对植株形态特征的影响

从苗期 (图 2A–D) 至成熟期 (图 2E–L), 辐照组植株高度均低于对照组。播种 5 个月后统计株高 (表 1), 发现各剂量辐照处理均显著抑制牛至生长, 减缓其生长速度, 尤其是 40 Gy 处理组, 平均株高仅 15.50 cm。同时, 高剂量 (40 Gy) 处理使植株茎粗明显增加, 而低

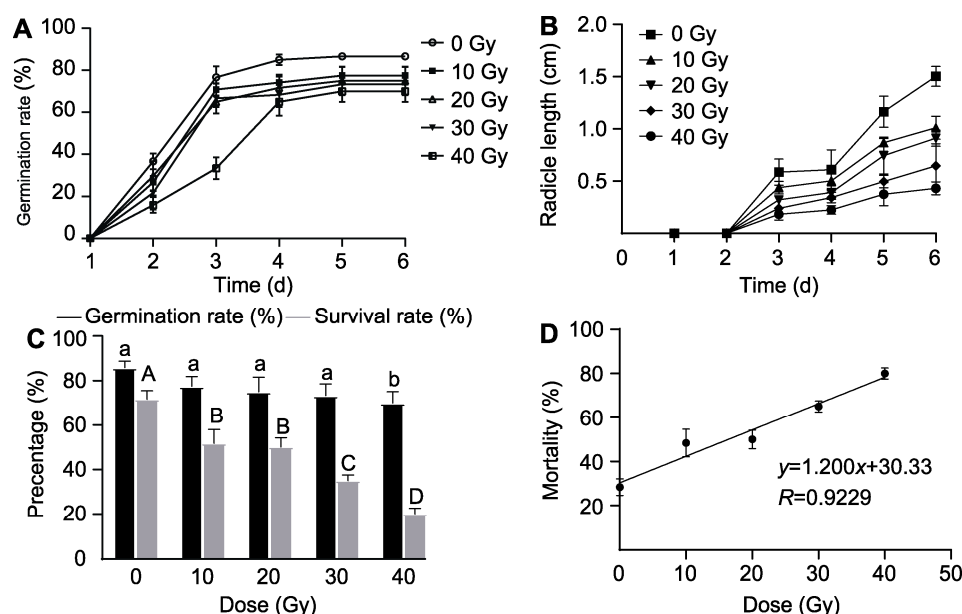
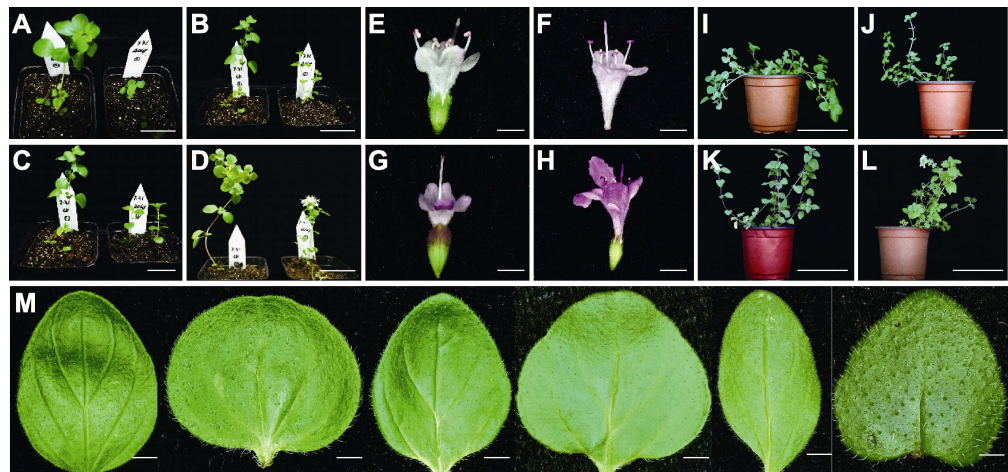


图1 不同剂量 $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ 辐照后牛至种子的萌发与成苗情况

(A) 萌发率; (B) 胚根长度; (C) 萌发率和存活率; (D) 剂量效应曲线。不同小写字母表示各处理间萌发率差异显著 ( $P<0.05$ )。不同大写字母表示各处理间存活率差异显著 ( $P<0.05$ )。

**Figure 1** Germination and seedling formation of oregano seeds treated with different doses of  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$  radiation (A) Germination rate; (B) Radicle length; (C) Germination rate and survival rate; (D) Dose effect curve. Different lowercase letters indicate significant differences in germination rate among different treatments ( $P<0.05$ ). Different capital letters indicate significant differences in survival rate among different treatments ( $P<0.05$ ).



**图 2**  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$  射线辐照处理后牛至的形态变异  
(A)–(D) 苗期突变: 矮化(A)、基部分枝(B)、节间距缩短(C)和花期提前(D); (E)–(H) 花色变异: 对照株(CK)花瓣粉白色(E)、变异株 20-2 花瓣粉色(F)、10-11 花瓣白紫相间(G)和 10-4 花瓣紫色(H); (I)–(L) 株型变异: CK 匍匐(I)、突变株 20-13 直立(J)、30-5 直立(K) 和 10-19 直立(L); (M) 叶片形态突变, 从左至右依次为 CK、10-4、20-2、20-19、30-8 和 40-6。Bars=2 mm

**Figure 2** Phenotypic variation of oregano individual plants after  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$  radiation  
(A)–(D) Mutation at seedling stage: dwarfing (A), basal branching (B), shortening of internode spacing (C), and early flowering (D); (E)–(H) Variation of flower color: the petals were pink-white in control (CK) (E), pink in mutant 20-2 (F), white and violet in mutant 10-11 (G), and violet in mutant 10-4 (H); (I)–(L) Variation of plant shape: the plant shape changed from creepers of CK (I), to up straight of 20-13 (J), 30-5 (K), and 10-19 (L); (M) Variation of leaf morphology, from left to right were CK, 10-4, 20-2, 20-19, 30-8, and 40-6. Bars=2 mm

**表 1** 不同剂量 $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ 射线辐照对牛至分枝数和叶形的影响(平均值 $\pm$ 标准差)

**Table 1** Effects of different doses of  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$  radiation on branch number and leaf shape of *Origanum vulgare* (means $\pm$ SD)

Dose (Gy)	Height (cm)	Stem diameter (mm)	Number of branches	Leaf length (cm)	Leaf width (cm)	Leaf length and width ratio
0	28.10 $\pm$ 3.87 a	0.87 $\pm$ 0.84 b	4.20 $\pm$ 0.79 bc	2.14 $\pm$ 0.22 b	1.49 $\pm$ 0.20 b	1.43 $\pm$ 0.03 a
10	18.60 $\pm$ 2.99 b	0.94 $\pm$ 0.14 b	4.51 $\pm$ 1.36 b	2.36 $\pm$ 0.16 a	1.58 $\pm$ 0.18 b	1.49 $\pm$ 0.13 a
20	20.00 $\pm$ 2.83 b	0.97 $\pm$ 0.05 b	6.02 $\pm$ 1.25 a	2.31 $\pm$ 0.12 ab	1.76 $\pm$ 0.19 a	1.31 $\pm$ 0.06 b
30	19.10 $\pm$ 2.23 b	1.06 $\pm$ 0.09 b	4.00 $\pm$ 0.94 b	2.03 $\pm$ 0.17 ab	1.49 $\pm$ 0.12 b	1.36 $\pm$ 0.10 b
40	15.50 $\pm$ 2.23 c	1.10 $\pm$ 0.01 a	3.02 $\pm$ 0.82 c	1.85 $\pm$ 0.24 c	1.29 $\pm$ 0.19 c	1.43 $\pm$ 0.08 a

不同小写字母表示各处理间差异显著( $P<0.05$ )。

Different lowercase letters indicate significant differences among different treatments ( $P<0.05$ ).

剂量(10、20和30 Gy)辐照未对茎粗产生显著影响。此外,我们筛选得到花色突变的单株(图2E–H),对照组的花色为粉白色,辐照群体中出现粉色、浅紫色和深紫色。在苗期可观察到较多明显的基部分枝突变(图2B),成熟期出现半直立、直立的株型变异单株(图2I–L)。分枝数统计(表1)表明,与对照组相比,辐照剂量为20 Gy的处理组分枝数显著增多。

$^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ 射线辐照对牛至叶片形态也有显著影响(图2M),辐照处理后牛至叶形发生多种变化。对照组

的叶片呈现长椭圆形,叶尖相对平滑;处理组的叶片其叶形由长椭圆形变为椭圆形、针叶形等,叶尖由光滑变为急尖、钝尖和圆滑。统计叶长和叶宽变化(表1),发现10 Gy低剂量辐照处理组叶长显著高于对照,40 Gy高剂量辐照处理组叶长显著低于对照,而中间剂量20和30 Gy辐照处理组叶长与对照差异不显著;叶宽则在20 Gy辐照处理下显著增加,在40 Gy辐照处理下显著减小。20和30 Gy处理下叶长宽比均发生显著变化,叶长宽比显著减小,叶形偏向扁圆。



## 2.3 $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ 射线辐照对叶片腺毛密度和大小的影响

腺毛在荧光显微镜下自发荧光, 观察结果表明, 辐照处理后腺毛密度和大小发生明显变化(图3A–F)。分别对各处理组叶片近轴端和远轴端腺毛密度进行统计分析(表2), 结果表明, 除20 Gy处理外, 其它各处理组腺毛密度均呈现显著降低的趋势。对腺毛大小的统计表明, 近轴端20–40 Gy处理组的腺毛显著增大, 远轴端仅20 Gy处理组的腺毛显著大于对照组, 其它处理与对照无显著差异。对存活的163个单株进行腺毛密度和腺毛大小的统计(图3G, H), 结果表明, 与对照相比, 在辐照群体中均出现近轴端叶片和远轴端叶片腺毛密度增大和减小的个体单株, 且叶片近轴端和远轴端腺毛同时增大的单株数量多于腺毛密度同时增大的单株。由此可见,  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ 射线对腺毛大小的影响大于对腺毛密度的影响。

## 2.4 $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ 射线辐照对叶片中香芹酚和百里香酚含量的影响

### 2.4.1 $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ 射线辐照变异株的挥发性成分分析

利用SPME-GC-MS法对腺毛密度与体积显著变化的25个单株进行挥发性成分的定性定量分析, 在对照中共鉴定到14种挥发性成分(图4A)。 $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ 射线辐照对牛至挥发性成分的种类影响较小, 主要影响挥发性成分的含量; 处理组与对照组仅在柠檬烯(limonene)、罗勒烯( $\beta$ -ocimene)、甜没药烯( $\beta$ -bisabolene)和甘香烯(elixene)等几个含量较少的成分上存在种类上的差异。

主成分得分图(图4B)显示, 贡献率为0.362的第1主成分(principal component 1, PC1)与贡献率为

**图3** 不同剂量 $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ 辐照对牛至存活单株腺毛密度和腺毛大小的影响

(A)–(F) 荧光显微镜下观察到的腺毛密度变异(bars=200  $\mu\text{m}$ ); (G) 腺毛密度聚类热图; (H) 腺毛大小聚类热图, 内环表示近轴端, 外环表示远轴端。

**Figure 3** Effects of different doses of  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$  radiation on the density and size of glandular hair of survivals

(A)–(F) The varied density of glandular hairs under fluorescence microscopy (bars=200  $\mu\text{m}$ ); (G) Cluster thermography of glandular hair density; (H) Cluster thermography of glandular hair size, the inner ring represents the adaxial end, and the outer ring represents the abaxial end.

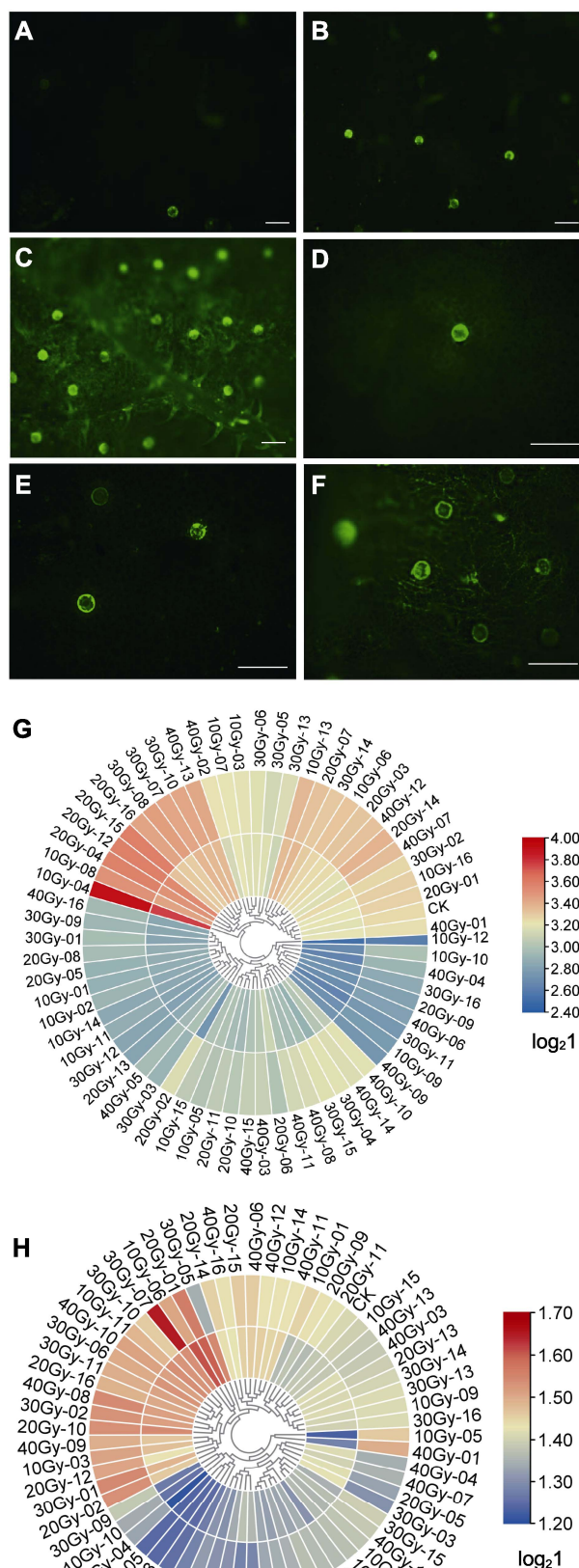


表2 不同剂量<sup>60</sup>Co-γ射线辐照对牛至腺毛密度和大小的影响(平均值±标准差)

Table 2 Effects of different doses of <sup>60</sup>Co-γ radiation on density and size of glandular hair of oregano (means±SD)

Dose (Gy)	Glandular hair density (·cm <sup>-2</sup> )		Glandular hair size (·mm <sup>-2</sup> )	
	Adaxial end	Abaxial end	Adaxial end	Abaxial end
0	163.53±11.43 a	182.22±6.07 a	0.33±0.00 c	0.37±0.01 b
10	138.56±15.89 b	155.04±14.09 b	0.34±0.02 bc	0.37±0.01 b
20	160.15±8.23 a	182.18±12.68 a	0.42±0.11 a	0.44±0.15 a
30	137.49±5.47 b	156.79±20.84 b	0.39±0.01 ab	0.39±0.01 b
40	123.11±2.89 b	147.89±6.73 b	0.37±0.00 b	0.38±0.01 b

不同小写字母表示各处理间差异显著( $P<0.05$ )。

Different lowercase letters indicate significant differences among different treatments ( $P<0.05$ ).

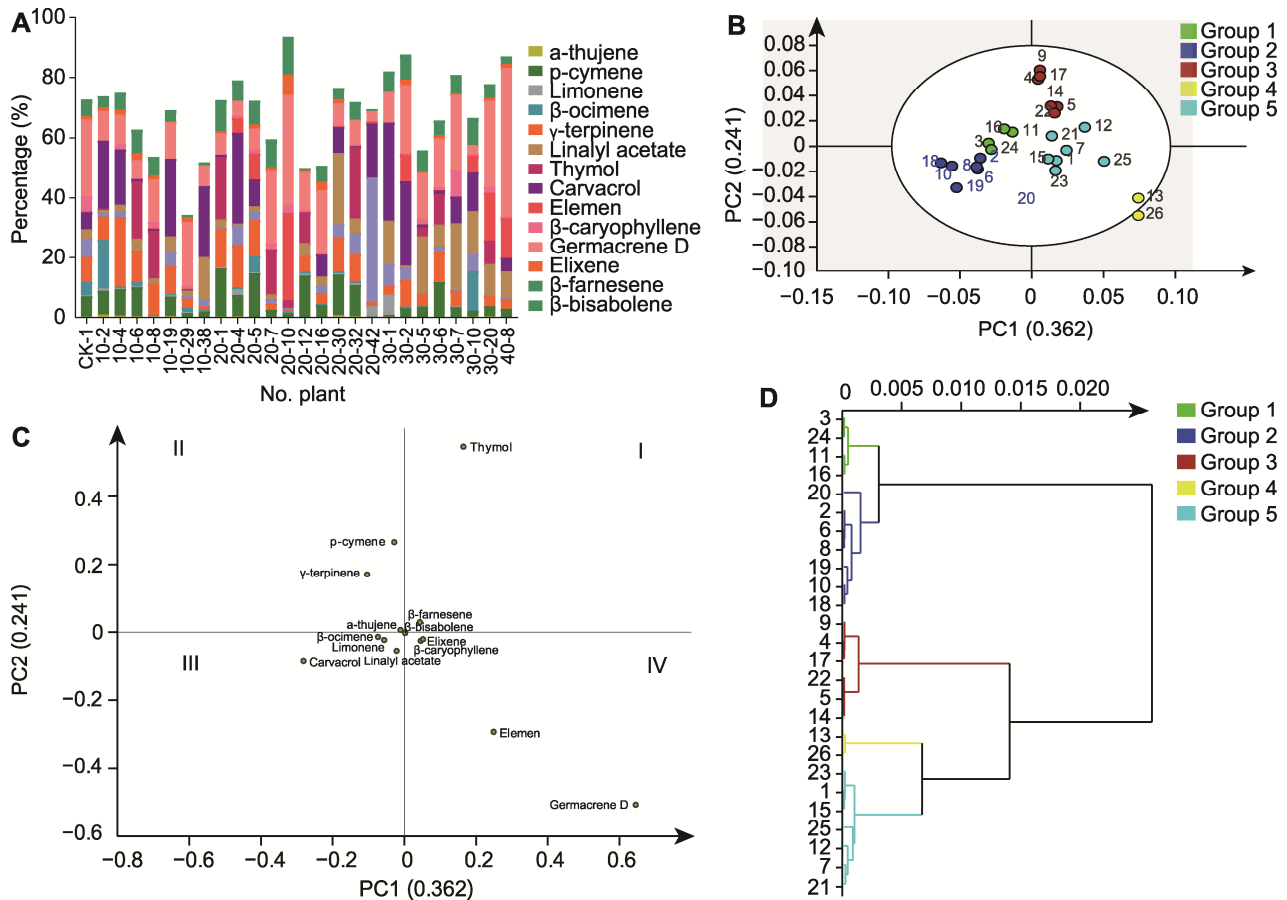


图4 25株<sup>60</sup>Co-γ辐照变异株的挥发性成分分析

(A) 成分占比分析; (B) 主成分得分图; (C) 主成分因子载荷图; (D) 层次聚类分析

Figure 4 Analysis of volatile components of 25 mutants after <sup>60</sup>Co-γ irradiation

(A) Analysis of proportion of components; (B) PCA score chart; (C) PCA factor load chart; (D) Hierarchical cluster analysis

0.241的第2主成分(principal component 2, PC2)将筛选出来的25个单株诱导的挥发物分为5组。单因素方差分析表明, 5组挥发物在PC1上的得分数存在显著差异。这说明射线辐照后5个组中各单株的挥发性成分

各不相同, 表明<sup>60</sup>Co-γ射线辐照可引起挥发性成分的广泛变异。因子载荷图(图4C)显示, γ萜品烯和β侧柏烯等分布在第II象限, 是Group1的特征组分; 香芹酚及其衍生物分布在第III象限, 是Group2的特征组分;

对伞花烃和百里香酚分布于第I象限, 是Group3的特征组分; 大根香叶烯分布在第IV象限外围, 是Group4的特征组分;  $\beta$ -石竹烯和 $\beta$ -金合欢烯主要分布于第I和IV象限的坐标轴正方向, 是Group5的特征组分。

对各单株在PC1与PC2上的得分进行HCA分析(图4D), 显示当最短距离在0.005–0.025之间时, 25个单株可聚为5类。其中, 对照所在的Group5为 $\beta$ -石竹烯和大根香叶烯等倍半萜为主成分的化学型, 其它4组的植株在挥发性成分上与对照组差异明显, 表明射线辐照可诱导多种化学型。

#### 2.4.2 香芹酚/百里香酚含量变异单株的筛选

成分占比分析(图4A)表明, 对照组(CK)本底水平的香芹酚含量并不高, 仅占总成分的8.11%, 百里香酚含量更低(0.35%); 同时, 25株腺毛指标优株的挥发性成分检测表明, 82.14%的辐照单株中香芹酚或百里香酚含量升高, 且香芹酚与百里香酚的含量存在此消彼长的关系(图5A, B)。

结合上述分析, Group1和3中的10株分别为射线辐照诱导的香芹酚和百里香酚型牛至, 其叶片中香芹酚或百里香酚含量相比对照显著升高。进一步筛选到4株香芹酚含量占主导及2株百里香酚含量占主导的单株(图5C), 其中, 变化最显著的单株中香芹酚含量从8.11%升高至29.34%, 百里香酚变异单株含量从0.35%升高至20.48% (图5D)。在对照植株中, 大根香叶烯含量最高, 而筛选得到的10-2和20-4单株挥发性成分中香芹酚含量最高, 且香芹酚含量与对照差异显著( $P<0.01$ )。筛选得到的20-7为百里香酚含量显著升高的突变单株, 其含量从 $0.44\text{ ng}\cdot\text{mg}^{-1}$ 升至 $40.08\text{ ng}\cdot\text{mg}^{-1}$ , 与对照组差异显著( $P<0.05$ )。

### 2.5 讨论

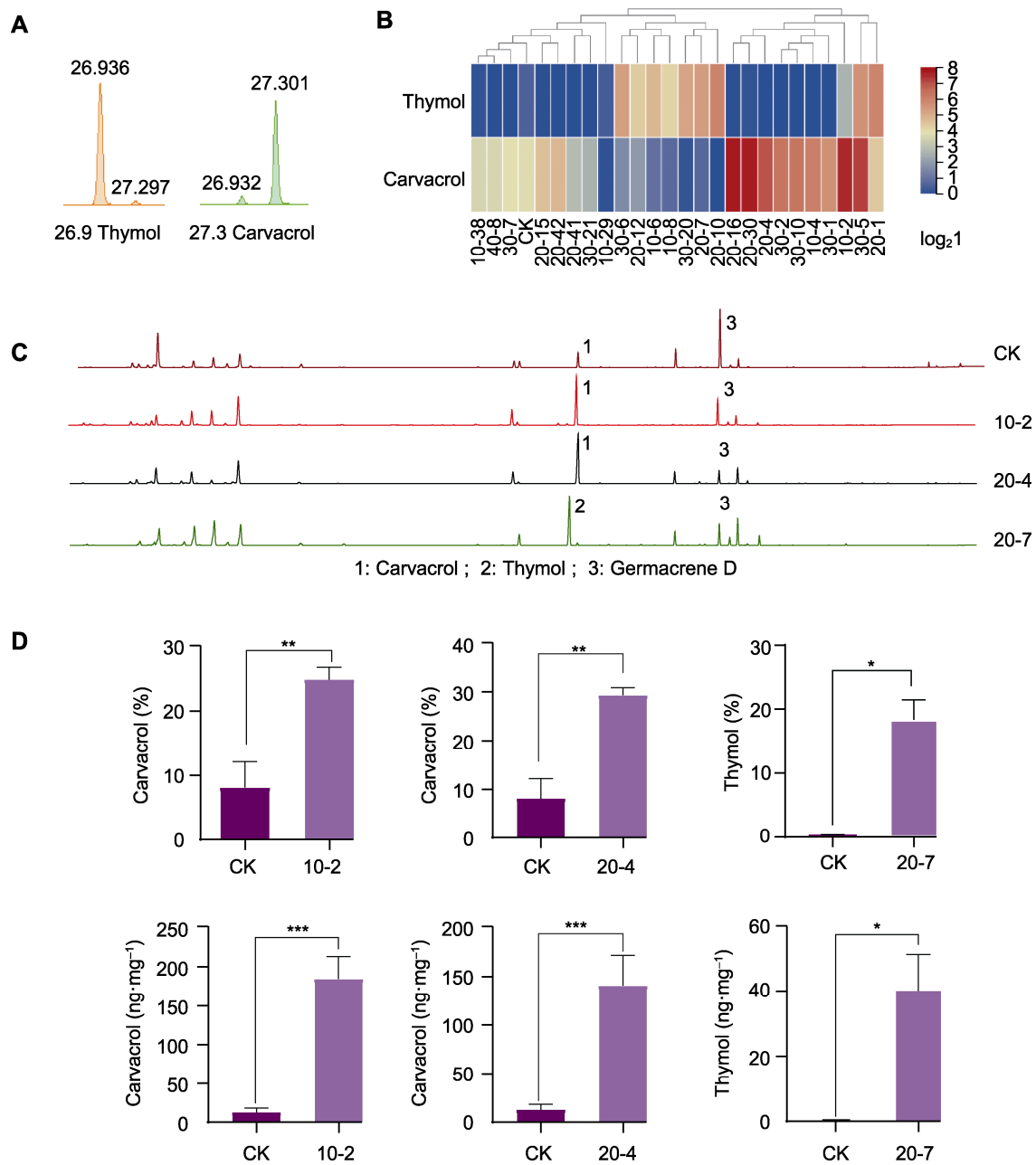
植物腺毛中的次生代谢产物不仅在植物生长发育和环境适应中发挥重要作用(李好勋和王国栋, 2015), 而且具有治疗疾病的强大功效, 如抗疟疾的特效药青蒿素是从黄花蒿(*Artemisia annua*)中提取出的萜类物质; 抗肿瘤药物长春新碱来源于长春花(*Catharanthus roseus*)的单萜类吲哚生物碱(Tang et al., 2014; Pan et al., 2016)。但由于“兴趣化合物”结构复杂, 人工化学合成成本高, 目前科研人员仍致力于在植物体内通过多种方法提升“兴趣化合物”的含量(张婷婷

等, 2018; 董燕梅等, 2020)。而诱变育种能打破植物原有基因库的限制, 提高变异率, 为人工筛选提供大量候选材料(Kazama et al., 2017)。 $^{60}\text{Co-}\gamma$ 辐射是一种稀疏电离辐射, 已经在多种芳香和药用植物中进行了育种实践(Seo et al., 2007; Vardhan and Shukla, 2017)。

本研究对不同剂量 $^{60}\text{Co-}\gamma$ 辐照下牛至种子萌发、存活情况及表型的变异程度进行检测, 发现牛至种子的半致死剂量接近20 Gy ( $\text{LD}_{50}=16.39\text{ Gy}$ )。对分枝数、叶形指数、腺毛密度和腺毛大小等指标的观测发现, 20 Gy剂量下变异程度较高。因此, 我们认为20 Gy可作为牛至种子诱变的适宜剂量。物理诱变引起植物表型变异已有很多研究。例如, 王晶等(2003)发现离子束对紫松果菊(*Echinacea purpurea*)种子的诱变适宜剂量为 $10^{11}\text{ ions}\cdot\text{cm}^{-2}$ 和 $10^{12}\text{ ions}\cdot\text{cm}^{-2}$ , 这2个剂量下 $\text{M}_1$ 代植株出现花期、花径、花色、瓣形或瓣数等广泛变异类型。研究表明,  $^{60}\text{Co-}\gamma$ 辐照引起牛至丰富的表型变异, 由于对照(图2I)呈现典型的匍匐状态和向地生长, 对后续机械化收割和商品化生产极为不利, 因而选育株型改善的变异品种十分必要。分枝数是影响株型的关键指标, 本研究筛选到多株分枝数增多的变异植株, 表明 $^{60}\text{Co-}\gamma$ 辐照是诱导牛至株型变异单株的有效手段。

由于辐照后单株变异广泛, 且变异群体巨大, 我们选用4个剂量处理得到163株存活单株, 仅凭形态特征无法判断变异株中香芹酚或百里香酚含量是否升高, 因此, 高效且可靠的筛选指标尤为重要。腺毛是高等植物表面的特化器官, 是植物表皮毛的一种, 其显著特征是可以特异性地合成、储存和分泌大量次生代谢物, 而牛至挥发性成分中的单萜和倍半萜广泛分布于腺毛中。前人于1998–2000年在希腊收集了30个不同自然种群的牛至样本, 并对精油含量和腺毛密度进行了研究, 结果表明, 牛至自然种群中精油含量和腺毛密度之间存在高度正相关, 提高腺毛密度可改变植物产生次生代谢物的能力(Gavalas et al., 2011)。而腺毛横截面积反映了单个腺毛精油产量的大小。因此, 本研究选用腺毛密度和腺毛大小2项指标进行挥发性成分优株的前期筛选, 从选出的25个单株中, 成功筛选到香芹酚或百里香酚含量升高的变异单株。

芳香植物精油中含有大量挥发性成分, 这些成分因植物的部位、采集时间、提取方法和地理气候条件



**图5** <sup>60</sup>Co-γ辐照后筛选成分优株的香芹酚和百里香酚含量分析  
(A) 香芹酚与百里香酚的合成竞争; (B) 25株辐照变异株香芹酚与百里香酚含量热图分析, 红色方向代表数值增大, 蓝色方向代表数值减小, 所有数据均经过对数转换; (C) 对照与筛选出的成分优株色谱图; (D) 对照与筛选出的成分优株香芹酚及百里香酚含量对比。每株叶片混样, 重复测量3次取平均值。CK: 对照。\* 0.05水平差异显著, \*\* 0.01水平差异极显著, \*\*\* 0.001水平差异极显著

**Figure 5** Content analysis of carvacrol and thymol in selected superior plants after <sup>60</sup>Co-γ radiation  
(A) Carvacrol competes with thymol in synthesis; (B) Thermogram analysis of carvacrol and thymol content in 25 irradiated plants, the red direction represents an increase in the value and the blue direction represents a decrease in the value, all the data were processed by logarithm; (C) Chromatogram of components between control and treated individuals; (D) Content comparison of carvacrol and thymol between control and treated individuals. The leaves of each sample were mixed and analyzed three times, where the average was taken. CK: Control. \* significant differences at the level of 0.05, \*\* extremely significant differences at the level of 0.01, \*\*\* extremely significant differences at the level of 0.001



等因素而异,也受胁迫/激素水平等外界因素的诱导而改变。物理辐照刺激植物产生应激反应,导致植物形态变化与次生代谢产物的积累(Eilert, 1987; Fan et al., 2004)。研究发现, $\gamma$ 射线辐照当归(*Angelica gigas*)可使其桉叶油醇和马鞭草酮等含量显著升高(Seo et al., 2007); Topuz和Ozdemir (2003)发现10 kGy剂量 $\gamma$ 射线辐照后的辣椒(*Capsicum annuum*)变异株中辣椒素显著增加。牛至主要挥发物成分包括香芹酚、百里香酚、月桂烯、 $\alpha$ -松油烯、对伞花烃、 $\gamma$ -松油烯和(E)- $\beta$ -石竹烯等(Leyva-López et al., 2017),其中香芹酚和百里香酚是牛至精油中具抗菌活性的主要成分。本研究检测到多株香芹酚或百里香酚含量升高的突变单株,表明 $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ 射线辐照可有效提高牛至中的活性成分。此外,检测过程中发现香芹酚和百里香酚含量此消彼长,推测这与文献中所报道的香芹酚和百里香酚合成通路有密切关系,二者合成底物相同(均为 $\gamma$ -萜品烯和对伞花烃),但催化酶不同,因此合成反应可能存在竞争关系(Majdi et al., 2017; Kowalczyk et al., 2020)。

根据化合物占比的不同,可将牛至划分为不同的化学型,一般以主要成分命名,如香芹酚、百里香酚、 $\beta$ -香茅醛和1,8-桉树脑(Leyva-López et al., 2017)。Lukas等(2015)根据来自17个国家51个种群的502株植物提取物中cymyl-化合物、sabinyl化合物和芳樟醇/乙酸芳樟醇的比例,定义了*O. vulgare* 3种化学类型。在本实验中,对照属于含油量较低的化学型,积累sabinyl化合物和大量的无环化合物( $\beta$ -罗勒烯或月桂烯),并伴有大量的倍半萜烯(如 $\beta$ -石竹烯)。经不同剂量的 $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ 射线辐照后,诱变产生了其它化学型的变异株,包括理想的含油量增高的香芹酚型和百里香酚型,但芳樟醇/乙酸芳樟醇途径积累的化合物占主导的类型在本实验中未检测到。我们将25个单株聚为5类(图4D),其中, $\beta$ -石竹烯和大根香叶烯2种化学型遗传距离较近,以倍半萜类成分为主,属于含油量较低的品系。 $\gamma$ -萜品烯化学型与香芹酚型在主成分分析中聚类关系较近,这与 $\gamma$ -萜品烯是香芹酚和百里香酚的合成前体密切相关。Lukas等(2015)发现,在*O. vulgare*种内,高活性的cymyl途径以及香芹酚和/或百里香酚的积累是精油产量的先决条件。本研究筛选到含油量高的植株体内正是积累了较多的香芹酚或百里香酚以及它们的合成前体 $\gamma$ -萜品烯。

综上所述, $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ 射线辐照可作为芳香植物牛至提高挥发性活性成分含量的有效手段之一,但内在机制还需进一步研究。有研究表明,辐射后生物膜过氧化产生活性物质,影响生物膜构象和多酚化合物形成积累,促进细胞核内的重要代谢过程,有利于次生代谢产物的积累(刘录祥等, 2009; 黄桂丹, 2016),低剂量辐射对牛至活性次生代谢成分的影响可能也是由于 $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ 辐射的刺激效应引起的。作为精油产量较高的优良品种候选材料,本研究筛选到的香芹酚或百里香酚高含量变异单株仍然需要连续多年的性状观察和筛选,进而作为有益变异单株加以选育。

## 参考文献

- 董燕梅, 张文颖, 凌正一, 李靖锐, 白红彤, 李慧, 石雷 (2020). 转录因子调控植物萜类化合物生物合成研究进展. 植物学报 55, 340–350.
- 郝渊鹏, 李静一, 杨瑞, 李慧, 白红彤, 石雷 (2020). 芳香植物精油的抗菌性及在动物生产中的应用. 植物学报 55, 644–657.
- 黄桂丹 (2016).  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ 射线辐射育种研究进展. 林业与环境科学 32(2), 107–111.
- 李好勋, 王国栋 (2015). 植物腺毛次生代谢产物生物合成的研究进展. 中国科学: 生命科学 45, 557–568.
- 刘录祥, 郭会君, 赵林姝, 李军辉, 古佳玉, 赵世荣, 王晶 (2009). 植物诱发突变技术育种研究现状与发展前景. 核农学报 23, 1001–1007.
- 王晶, 刘录祥, 赵世荣, 杨俊诚, 郭会君, 赵林姝, 陈文华 (2003).  $^7\text{Li}$ 离子束诱变紫果菊的生物效应研究初报. 核农学报 17, 405–408.
- 余蓉培, 李杨, 李东, 詹选怀, 石雷 (2015). 莱菔蕨绿色球状体对 $^{60}\text{Co}$ 射线的辐射敏感性. 植物学报 50, 565–572.
- 曾俊峰, 陈艳霞, 陈平, 刘焱文, 刘军锋 (2013). 不同产地牛至挥发性成分的SPME/GC/MS法分析. 时珍国医国药 24, 37–39.
- 张婷婷, 马嘉伟, 王路尧, 唐克轩, 李杉, 赵静雅 (2018). 过量表达黄烷酮3-羟化酶基因(*AaF3H*)提高青蒿中青蒿素的含量. 生物技术进展 8, 55–62.
- Arabaci T, Çelenk S, Özcan T, Martin E, Yazici T, Açar M, Üzel D, Dirmenci T (2021). Homoploid hybrids of *Origanum* (Lamiaceae) in Turkey: morphological and molecular evidence for a new hybrid. *Plant Biosyst Int J Deal Asp Plant Biol* 155, 470–482.

- Bouyahya A, Zengin G, Belmehdi O, Bourais I, Chamkhi I, Taha D, Benali T, Dakka N, Bakri Y** (2020). *Origanum compactum* Benth., from traditional use to biotechnological applications. *J Food Biochem* **44**, e13251.
- Eilert U** (1987). Elicitation: methodology and aspects of application. In: Constabel F, Vasil IK, eds. *Cell Culture in Phytochemistry*. Amsterdam: Elsevier Science. pp. 153–196.
- Elshafie HS, Armentano MF, Carmosino M, Bufo SA, De Feo V, Camele I** (2017). Cytotoxic activity of *Origanum vulgare* L. on hepatocellular carcinoma cell line HepG2 and evaluation of its biological activity. *Molecules* **22**, 1435.
- Esnault MA, Legue F, Chenal C** (2010). Ionizing radiation: advances in plant response. *Environ Exp Bot* **68**, 231–237.
- Fan XT, Thayer DW, Sokora KJB** (2004). Changes in growth and antioxidant status of alfalfa sprouts during sprouting as affected by gamma irradiation of seeds. *J Food Prot* **67**, 561–566.
- Fikry S, Khalil N, Salama O** (2019). Chemical profiling, biostatic and biocidal dynamics of *Origanum vulgare* L. essential oil. *AMB Express* **9**, 41.
- Gavalas NP, Kalburtji KL, Kokkini S, Mamolos AP, Veresoglou DS** (2011). Ecotypic variation in plant characteristics for *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* populations. *Biochem Syst Ecol* **39**, 562–569.
- Jan S, Parween T, Siddiqi TO, Mahmooduzzafar** (2012). Effect of gamma radiation on morphological, biochemical, and physiological aspects of plants and plant products. *Environ Rev* **20**, 17–39.
- Kazama Y, Ishii K, Hirano T, Wakana T, Yamada M, Ohbu S, Abe T** (2017). Different mutational function of low- and high-linear energy transfer heavy-ion irradiation demonstrated by whole-genome resequencing of *Arabidopsis* mutants. *Plant J* **92**, 1020–1030.
- Koseki PM, Villavicencio ALCH, Brito MS, Nahme LC, Sebastião KI, Rela PR, Almeida-Muradian LB, Mancini-Filho J, Freitas PCD** (2002). Effects of irradiation in medicinal and edible herbs. *Radiat Phys Chem* **63**, 681–684.
- Kowalczyk A, Przychodna M, Sopata S, Bodalska A, Fecka I** (2020). Thymol and thyme essential oil-new insights into selected therapeutic applications. *Molecules* **25**, 4125.
- Leyva-López N, Gutiérrez-Grijalva EP, Vázquez-Olivo G, Heredia JB** (2017). Essential oils of oregano: biological activity beyond their antimicrobial properties. *Molecules* **22**, 989.
- Lukas B, Schmiderer C, Novak J** (2015). Essential oil diversity of European *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae). *Phytochemistry* **119**, 32–40.
- Majdi M, Malekzadeh-Mashhady A, Maroufi A, Crocoll C** (2017). Tissue-specific gene-expression patterns of genes associated with thymol/carvacrol biosynthesis in thyme (*Thymus vulgaris* L.) and their differential changes upon treatment with abiotic elicitors. *Plant Physiol Bioch* **115**, 152–162.
- Morshedloo MR, Mumivand H, Craker LE, Maggi F** (2018). Chemical composition and antioxidant activity of essential oils in *Origanum vulgare* subsp. *gracile* at different phenological stages and plant parts. *J Food Process Preserv* **42**, e13516.
- Oladosu Y, Rafii MY, Abdullah N, Hussin G, Ramli A, Rahim HA, Miah G, Usman M** (2016). Principle and application of plant mutagenesis in crop improvement: a review. *Biotechnol Biotechnol Equip* **30**, 1–16.
- Oniga I, Puscas C, Silaghi-Dumitrescu R, Olah NK, Sevastre B, Marica R, Marcus I, Sevastre-Berghian AC, Benedec D, Pop CE, Hanganu D** (2018). *Origanum vulgare* ssp. *vulgare*: chemical composition and biological studies. *Molecules* **23**, 2077.
- Pan QF, Mustafa NR, Tang KX, Choi YH, Verpoorte R** (2016). Monoterpenoid indole alkaloids biosynthesis and its regulation in *Catharanthus roseus*: a literature review from genes to metabolites. *Phytochem Rev* **15**, 221–250.
- Rajput JD, Bagul SD, Pete UD, Zade CM, Padhye SB, Bendre RS** (2018). Perspectives on medicinal properties of natural phenolic monoterpenoids and their hybrids. *Mol Divers* **22**, 225–245.
- Sarrou E, Tsivelika N, Chatzopoulou P, Tsakalidis G, Menexes G, Mavromatis A** (2017). Conventional breeding of Greek oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) and development of improved cultivars for yield potential and essential oil quality. *Euphytica* **213**, 104.
- Seo HY, Kim JH, Song HP, Kim DH, Byun MW, Kwon JH, Kim KS** (2007). Effects of gamma irradiation on the yields of volatile extracts of *Angelica gigas* Nakai. *Radiat Phys Chem* **76**, 1869–1874.
- Sharifi-Rad M, Varoni EM, Iriti M, Martorell M, Setzer WN, del Mar Contreras M, Salehi B, Soltani-Nejad A, Rajabi S, Tajbakhsh M, Sharifi-Rad J** (2018). Carvacrol and human health: a comprehensive review. *Phytother Res* **32**, 1675–1687.
- Tang KX, Shen Q, Yan TX, Fu XQ** (2014). Transgenic approach to increase artemisinin content in *Artemisia annua* L. *Plant Cell Rep* **33**, 605–615.

Topuz A, Ozdemir F (2003). Influences of  $\gamma$ -irradiation and storage on the carotenoids of sun-dried and dehydrated paprika. *J Agric Food Chem* **51**, 4972–4977.

Vardhan PV, Shukla LI (2017). Gamma irradiation of medicinally important plants and the enhancement of secondary metabolite production. *Int J Radiat Biol* **93**, 967–979.

## Effects of $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ Ray Radiation on Morphology and Volatile Components of *Origanum vulgare*

Yihao Yan<sup>1,2</sup>, Di Wang<sup>1\*</sup>, Jingyi Li<sup>1</sup>, Wenying Zhang<sup>1</sup>, Yuanpeng Hao<sup>1</sup>, Fei Xia<sup>1</sup>  
Hui Li<sup>1</sup>, Hongtong Bai<sup>1</sup>, Lei Shi<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Key Laboratory of Plant Resources and Beijing Botanical Garden, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China; <sup>2</sup>University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

**Abstract** Carvacrol and thymol, the main components of essential oil in oregano (*Origanum vulgare*), have strong antibacterial activity, and have big potential to replace antibiotics. In order to acquire valuable genetic variation in oregano,  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$  ray radiation was utilized in breeding of oregano. The volatile components were analyzed by SPME-GC-MS, also principal component analysis and hierarchical clustering composition were performed. The effects of  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$  ray radiation on morphological characteristics were studied, including glandular hair density, glandular hair size and volatile components of  $M_1$  generation of oregano. The results showed that the  $\text{LD}_{50}$  of oregano seeds was 16.39 Gy; The plant height, stem diameter, branching number, leaf length and width of irradiated  $M_1$  generation were all changed, and several morphological mutants were selected; At the same time, the density and size of glandular hair changed in a variety of ways, and 25 mutants with significantly increase in density and size of glandular hair were selected from 163 surviving plants;  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$  ray treatment had little effect on volatile components, but significant effect on the content of volatile components, and 5 chemotypes in oregano were induced, including carvacrol-type, thymol-type,  $\gamma$ -terpinene-type,  $\beta$ -caryophyllene-type, and germacrene-type. Six mutants with high carvacrol and thymol were obtained. These results confirmed that  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$  ray radiation could be useful as an effective mutagenic method for oregano breeding, and the suitable radiation dose was 20 Gy. This study provided basic data and new way for the breeding and selection of new germplasm resources in oregano.

**Key words** oregano, radiation breeding, gamma ray, carvacrol, thymol, volatile components

Yan YH, Wang D, Li JY, Zhang WY, Hao YP, Xia F, Li H, Bai HT, Shi L (2021). Effects of  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$  ray radiation on morphology and volatile components of *Origanum vulgare*. *Chin Bull Bot* **56**, 533–543.

\* Authors for correspondence. E-mail: diwang@ibcas.ac.cn; shilei@ibcas.ac.cn

(责任编辑: 白羽红)