

密叶罗勒茎尖组织培养研究

刘芳¹ 邓林¹ 任伟毅¹ 李仲芳¹ 王春林²

(1.乐山师范学院 化学与生命科学学院,四川 乐山 614004

2.陇东学院 科学技术处,甘肃 庆阳 745000)

摘要:以密叶罗勒的茎尖为外植体,以期筛选出诱导愈伤组织分化和丛生芽生根的最佳培养基。同时研究了密叶罗勒组织培养中材料的消毒时间对消毒效果的影响。试验结果表明,培养基 MS+6-BA5.0mg/L+NAA0.1mg/L 是愈伤组织诱导分化相对较好的培养基;培养基 MS+6-BA0.3mg/L+NAA0.6mg/L 是罗勒生根培养较好的培养基。在以 75% 的酒精消毒 30 秒后,用 0.1% 的升汞消毒 2min,对试验材料的消毒效果相对较好。

关键词:密叶罗勒;消毒时间;诱导率;玻璃化

中图分类号:Q949.777 文献标识码:A 文章编号:1009-8666(2008)05-0035-03

密叶罗勒(*Ocimum basilicum*),原产于南亚、伊朗和中东地区^[1],俗称九层塔,是唇形科一年生草本植物。药用时,可健胃,促进消化,利尿强心,刺激子宫,保进分娩^[2]。同时罗勒也可食用^[3]。在花卉栽培方面,罗勒具有驱蚊功效,美化环境,清洁空气^[4]。罗勒的种植多采用种子栽培,但利用种子培养需要温暖湿润的气候^[5],罗勒所要求的生长条件在北方大规模生产受到一定的限制,利用组织培养可缩短其生长周期、避开不利于其生长的温度,用丛生芽进行快速繁殖,对扩大生产规模有很大帮助。其次,近年来随着新颖,时尚,易于管理的试管花卉的发展,开发新的试管花卉的品种迫在眉睫。密叶罗勒的组培试管苗株型紧凑,叶色浓绿,有较高的欣赏价值。

本试验探讨了密叶罗勒脱毒组织培养中消毒处理的最佳时间,以及愈伤组织诱导分化和丛生芽诱导生根的培养基配方,以缩短培养周期和降低培养成本,为罗勒无菌试管苗的大规模生产提

供技术支持。

1 材料和方法

1.1 供试材料

材料取自乐山师范学院化学与生命科学系温室内栽培罗勒侧枝上的幼芽。

1.2 材料的消毒处理

用自来水冲洗罗勒,洗净叶表面的尘土,置于超净工作台上,以 75% 的酒精消毒 30 秒时间,再用无菌水冲洗 3 次,将材料分三部分分别用 0.1% HgCl_2 消毒 1min、2min 和 5min,再用无菌水冲洗 3 次。

1.3 初代培养

将消毒处理过的材料,接种到培养基中。培养基以 MS 为基本培养基,添加以 6-BA, NAA(双因子)不同浓度组合的植物激素,26g/L 的蔗糖,并加入 5g/L 的琼脂粉作为固定剂,调节 PH 到 5.7~5.8。设计 9 个浓度梯度①,②,③,④,⑤,⑥,⑦,

⑧,⑨(见表1),在每一种浓度梯度下接种10瓶,每个瓶中接2个芽。培养温度为23℃,光照14小时。

表1 (6-BA与NAA双因子不同组合的九个浓度梯度)

6-BA NAA	3.0(mg/L)	4.0(mg/L)	5.0(mg/L)
0.05	①	②	③
0.1	④	⑤	⑥
0.2	⑦	⑧	⑨

统计公式:

愈伤组织诱导率=愈伤组织数/接种的外植体数×100%;

玻璃化率=玻璃化的丛生苗/分化产生的丛生苗×100%。

1.4 生根培养

以初代培养长出的丛生芽作为转接材料。不需经过表面消毒,直接将丛生芽从初代培养的愈伤组织上切下,接入以MS为基础培养基,6-BA固定浓度为0.3mg/L,NAA配合浓度分别为0.4,0.5,0.6mg/L(见表2)。同时加入26g/L的蔗糖,并加入5g/L的琼脂粉作为固定剂,调节PH到5.7~5.8。在每一个浓度梯度下接15瓶,每瓶接2丛生芽。培养温度为23℃,光照14小时。

表2 生根培养的浓度梯度

NAA	0.4(mg/L)	0.5(mg/L)	0.6(mg/L)
6-BA	①	②	③

(6-BA固定浓度为0.3mg/L。)

2 结果和分析

2.1 消毒时间对试验结果影响的比较

如表3所示,用相同的消毒方法,不同的消毒时间处理材料,分别是1min、2min和5min。10天后观察消毒效果。消毒1min的材料存活率为89.75%,死亡的材料叶片有褐色小斑点,其污染较为严重,为19.50%;消毒2min的材料存活率为82.97%,死亡的材料叶片变褐,但污染率为8.10%;消毒处理5min的材料全部死亡,发现叶片变褐,芽的顶端只留一点绿色,材料严重受到损伤,但未见受到污染。由于材料采自温室,比一般的材料幼嫩,所以对消毒时间以及消毒液的浓度控制都要求较严。试验结果表明,75%的酒精消毒30秒时间,再用无菌水冲洗3次,0.1%HgCl₂消毒2min,用无菌水冲洗3次,相对效果较好。

表3 消毒时间及效果

消毒时间	接种数	成活数	成活率	污染率
1 min	94	84	89.75%	19.50%
2 min	94	78	82.97%	8.10%
5 min	94	0	0	0

2.2 罗勒愈伤组织的诱导和分化

在9个浓度梯度下接种的罗勒四十天后都有愈伤组织产生,并且都不同程度的分化出丛生芽。如表4,5所示,浓度①、④、⑥这三组愈伤组织诱导率较高,分别为80%、75%、70%,而且①、⑥两组愈伤组织体积较大,生长旺盛;浓度④这一组产生的愈伤组织体积小,结构致密。浓度②、⑦、⑧这三组诱导率较低,都为15%,愈伤组织体积小,叶片颜色较浅。

同时也观察到出现玻璃化的现象。其中在浓度①、④、⑥三组中分化的丛生芽玻璃化率分别为31.25%、26.67%、60%,即⑥这一组的玻璃化程度最高。植物生长激素配比不协调,细胞分裂素浓度过高则容易产生玻璃化现象^[9]。在⑥这一组中玻璃化率达60%,6-BA浓度相对较高,可能是使其玻璃化程度高的原因。所以综合比较,本试验中以浓度①,即MS+0.05mg/LNAA+3.0mg/L6-BA为罗勒愈伤组织诱导分化的最佳培养基。

表4 6-BA与NAA配合对罗勒愈伤组织诱导分化的影响

浓度梯度	接种数	诱导数	诱导率%	玻璃化率%
①	20	16	80	31.25
②	20	3	15	33.33
③	20	12	60	8.33
④	20	15	75	26.67
⑤	20	13	65	30.77
⑥	20	14	70	60
⑦	20	3	15	34.75
⑧	20	3	15	33.33
⑨	20	9	45	100

表5 形成的愈伤组织和玻璃化情况

浓度梯度	愈伤组织特点	丛生芽玻璃化情况
①	体积较大 疏松成绿色 生长旺盛	玻璃化较严重
②	体积较大 致密成绿色	玻璃化较严重
③	体积较大 疏松成浅绿色 生长较旺盛	程度轻
④	较小 成绿色 结构致密	程度较轻
⑤	较小 致密成绿色	玻璃化较严重
⑥	体积大 疏松成黄绿色 生长旺盛	玻璃化程度较重
⑦	体积小 疏松 叶片变褐	玻璃化程度较重
⑧	较小 疏松成浅绿色	玻璃化程度较重
⑨	体积小 致密成绿色	玻璃化严重

2.3 罗勒转接生根培养

选取初代培养中长势较好的丛生苗接种到生根培养基上进行生根培养。一般是 2~3cm。30 天后,观察根的长势,记录如表 6 所示。结果表明,在这 3 个浓度梯度下,以培养基 MS+0.3mg/L6-BA+0.6mg/LNAA 为较好的生根培养基,生根率达 80%,且根的愈伤化程度较轻,根粗,根量适中。

表 6 6-BA 与 NAA 配合对生根培养的影响

浓度梯度	接种数	生根数	生根率	生根量	生根情况
①	15	6	40%	54	基部愈伤化较轻,根粗壮,有白色根毛,有气生根
②	15	6	40%	51	基部愈伤化严重,根细长,成浅绿色,没有气生根
③	15	12	80%	60	基部愈伤化较轻,根壮较短,有白色根毛,没有气生根

3 讨论

3.1 不同消毒时间对愈伤组织诱导分化的影响

由于材料采自温室大棚,比一般的材料幼嫩,所以对消毒时间以及消毒液的浓度控制都要求较严。本试验中分别采取用 0.1%的 HgCl₂ 消毒处理 1min、2min 和 5min,再用无菌水冲洗 3 次作为对比。消毒时间如果为 1min,由于消毒不充分而导致材料的污染加剧;消毒 5min,发现材料叶片有变黑的斑块,刀片切口处严重受伤成黑色。对材料

造成不可逆的伤害。试验结果表明,以 75%的酒精消毒 30 秒,再用无菌水冲洗 3 次,0.1%HgCl₂ 消毒 2min,用无菌水冲洗 3 次,未使材料受到伤害,且保证污染率较低,消毒效果较好。

3.2 试验中玻璃化现象

在植物生长激素不协调,细胞分裂素浓度过高的情况下会有玻璃化现象的产生^[9]。本试验采用了 NAA 和 6-BA 两种外源激素的不同浓度配比诱导罗勒愈伤组织产生和分化,所选的材料为密叶罗勒春季幼嫩的茎尖。在 9 个不同的 NAA 和 6-BA 植物激素浓度配比下对愈伤组织进行诱导分化,都有不同程度的玻璃化现象产生。而在丛生苗诱导生根时,玻璃化现象明显减少。造成玻璃化现象的可能原因有 2 个:①罗勒内源激素的干扰;②人为原因造成培养基中的外源激素配比不协调。本试验表明在不排除试验材料的内源生长素影响条件下,NAA 和 6-BA 的浓度比为 1:60 是诱导愈伤组织产生和分化相对较好的浓度配比;在诱导生根培养时 NAA 和 6-BA 的浓度比为 2:1,为较好的浓度配比。

3.3 NAA 与 6-BA 配合对生根培养的影响

试验结果表明,NAA 与 6-BA 的浓度比为 2:1 是罗勒较好的生根培养基。根据高的生长激素和细胞分裂素浓度比能够促进生根,若 NAA:6-BA 的比例大于 2,则可提高罗勒的生根率。

参考文献:

- [1]祝丽香. 罗勒的栽培及开发利用[J]. 时珍国医国药, 2005, 16(1).
- [2]蔡汗权. 罗勒的组织培养和快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 第 41 卷第 3 期
- [3]吴冬乾, 夏明月, 朱玉萍. 罗勒的实用栽培技术. [J]. 上海蔬菜, 2005(2):39.
- [4]胡一民. 今夏, 与蚊子说再见[J]. 花木盆景: 花卉园艺, 2003, (6).
- [5]祝丽香. 罗勒的研究与开发利用[J]. 北方园艺, 2005, (1).
- [6]王清连. 植物组织培养[M]. 北京: 中国农业出版社.
- [7]崔德才, 徐培文. 植物组织培养与工厂化育苗[M]. 北京: 化学工业出版社.
- [8]程家胜. 物组织培养与工厂化育苗技术[M].