

罗勒的愈伤组织诱导及植株再生

蔡汉权¹, 赖钟雄², 陈丹生¹, 刘喜斌¹, 陈明峰¹

(1. 韩山师范学院生物系, 广东潮州 521041; 2. 福建农林大学园艺植物生物工程研究所, 福建福州 350002)

摘要 研究了罗勒愈伤组织诱导及植株再生方法, 结果表明: 诱导罗勒愈伤组织的适宜培养基为 MS+6-BA 1 mg/L+NAA 1.0 mg/L; 丛生芽诱导的最佳培养基为 MS+6-BA 1 mg/L+KT 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L, 生根培养基为 MS+6-BA 1 mg/L+KT 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L。

关键词 罗勒; 组织培养; 愈伤组织; 植株再生

中图分类号 Q943.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2006)23-6128-02

Callus Induction and Rapid Multiplication of *Qcimumbasilicum*

CAI Han-quan et al (Department of Biology, Hanshan Teacher's College, Chaozhou, Guangdong 521041)

Abstract The callus induction and rapid multiplication of *Qcimumbasilicum* were studied. The results showed that the suitable medium for callus induction of *Qcimumbasilicum* was MS+6-BA 1 mg/L+NAA 1.0 mg/L, the best medium for bud induction was MS+6-BA 1 mg/L+KT 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L and the best medium for rooting was MS+6-BA 1 mg/L+KT 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L.

Key words *Qcimumbasilicum*; Tissue culture; Callus; Plant regeneration

罗勒(*Qcimumbasilicum*)为唇形科罗勒属一年生草本植物, 在世界许多国家均有分布, 是一种食药兼用的资源植物^[1]。常用于治疗风寒感冒, 具有抗肿瘤^[2]、抗氧化、降血糖作用, 在临床上可治疗动脉硬化、高血压、糖尿病、心肌梗塞等疾病^[3]。由于罗勒含有 B-芳樟醇、对烯丙基苯甲醚等几十种芳香成分^[4], 可用于制造以罗勒芳香油为原料的美容化妆品及皂用高级香精。目前罗勒日益成为国内外医疗保健、食品、化工领域的研究热点^[5,6]。

目前, 关于罗勒的研究主要针对罗勒提取物成分的分析及相关物质的药理及临床试验^[1,2,4,7,8], 另一方面主要是罗勒在饮食中的利用^[3,5]。在罗勒的培养方面只涉及到罗勒的传统种植^[9], 在罗勒的细胞工程方面也有一定的探索^[10-12]。笔者通过对罗勒愈伤组织诱导再生植株的方法进行研究, 试图找出愈伤组织的最佳诱导条件及植株快速繁殖的方法, 为大规模工厂化生产提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料 外植体材料为罗勒顶芽(1~2 cm)或带腋芽茎段(1~2节)。

1.2 方法

1.2.1 诱导愈伤组织。 剪取幼嫩顶芽或侧芽茎段, 用自来水清洗数次, 放入干净的烧杯中。在超净工作台上, 用 0.1% HgCl₂ 溶液浸泡 5 min, 无菌水冲洗 6~8 次。将材料修剪成约 1 cm 的茎段接种于培养基上, 每个处理接种外植体 30 个。培养基共 8 组(表 1)。所有培养基均含 1% 琼脂, 3% 蔗糖, pH 值 5.6~6.0。高压灭菌锅中 121℃ 下灭菌 20 min。培养温度为 (24±1)℃, 光照时间 12 h/d, 光照度为 1 000~1 500 lx。

1.2.2 由愈伤组织诱导芽。 将绿色、质地致密、表面有颗粒状突起的愈伤组织用于芽的诱导。诱导培养基按 3 因素 3 水平的正交法设计(表 2), 每组培养基接种愈伤组织 30 块, 培养条件同上。

1.2.3 继代培养。 将愈伤组织上生长的不定芽切下, 转入继代培养基中培养, 继代培养基为: MS+6-BA 1.0 mg/L+KT

0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L, 培养条件同上。

1.2.4 生根培养。 将继代培养中生长到 2~3 cm 的无根小苗(3 个叶节左右)转入生根培养基中, 进行根的诱导。生根培养基为: MS+6-BA 1 mg/L+IBA 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L, 培养条件同上。

1.2.5 试管苗的移栽。 当小苗长出 4~5 条, 长约 1~2 cm 的健壮的不定根时, 将带试管苗的培养瓶移至室内散射光处, 打开瓶盖 2~3 d, 即可完成炼苗过程。移栽时, 将小苗取出, 用自来水轻轻洗净, 保持根系不受损伤, 移入用 0.1% 甲基托布津喷淋消毒的腐殖土与珍珠岩(3:1)的基质中。加盖遮光网和塑料薄膜遮光、保温, 苗棚控制湿度 80%~90%, 温度 (25±2)℃, 10 d 后逐步揭膜, 20 d 后即可移入营养杯栽培。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织的诱导 将外植体接种到不同的培养基上, 1 个月对愈伤组织的存活率、诱导率、生长状况、类型和褐变程度进行统计, 结果见表 1。

表 1 培养基成分及愈伤组织诱导结果

培养基代号	生长调节剂/mg/L				接 成		愈伤组织			褐变程度
	2,4-D	NAA	KT	BA	种数	活数	数量	诱导率/%	类型	
L1	1.0	-	-	1.0	30	26	24	80	白色	+
L2	2.0	-	-	1.0	30	25	24	80	白色	++
L3	-	0.5	-	1.0	30	28	27	90	绿色	-
L4	-	1.0	-	1.0	30	28	28	93	绿色	-
L5	1.0	-	1.0	-	30	24	23	77	白色	+
L6	2.0	-	1.0	-	30	23	21	70	白色	++
L7	-	0.5	1.0	-	30	26	24	80	绿色	-
L8	-	1.0	1.0	-	30	28	26	87	绿色	-

注: + 表示轻度褐变; ++ 表示褐变较重; - 表示不褐变。

统计结果表明: ①所有培养基均能诱导愈伤组织的形成。②含生长素 2,4-D 诱导的愈伤组织多为黄白色, 愈伤组织生成后 2 周便开始减缓生长趋势, 不利于芽的诱导; 超过继代周期后开始褐变, 同时, 2,4-D 浓度越高, 愈伤组织褐变的时间越早, 褐变的程度越高。③含生长素 NAA 诱导的愈伤组织均为绿色, 并有颗粒状突起, 是诱导芽的理想材料; 愈伤组织持续生长的时间较长, 且褐变程度低, 褐变数量少。

结果表明: NAA 是诱导绿色愈伤组织的主要因素, 同时,

作者简介 蔡汉权(1967-), 男, 广东潮州人, 讲师, 从事植物组织培养的教学和研究工作。

收稿日期 2006-08-11

结合培养物的生长情况,诱导愈伤组织的适宜培养基为:MS + 6-BA 1 mg/L + NAA 1 mg/L。

2.2 由愈伤组织诱导芽 将绿色、质地致密、表面有颗粒状突起的愈伤组织转入芽诱导培养基中,在培养 30 d 后对芽诱导率进行统计,结果见表 2。

表 2 愈伤组织诱导芽结果

培养基代号	生长调节剂//mg/L			接种数	发芽数	芽诱导率 %
	BA	KT	NAA			
Y1	0.5	0.5	0	30	11	36.7
Y2	0.5	1.0	0.5	30	15	50.0
Y3	0.5	2.0	1.0	30	14	46.7
Y4	1.0	0.5	0.5	30	22	73.3
Y5	1.0	1.0	1.0	30	25	83.3
Y6	1.0	2.0	0	30	14	46.7
Y7	2.0	0.5	1.5	30	16	53.3
Y8	2.0	1.0	0	30	11	36.7
Y9	2.0	2.0	1.0	30	17	56.7

对正交试验各处理组间进行比较可以看出,试验组 4、5、6 的平均诱导率达到 67.8%,可见 6-BA 含量 1.0 mg/L 为影响芽诱导的主要因素。试验组 5 诱导丛生芽的诱导率最高,达到 83.3%,芽体生长良好。同时,在试验组 1、6、8 中由于生长素 NAA 的缺少使大部分愈伤组织无法诱导出芽丛,可见 NAA 也是诱导芽的必要因素。

结果表明:6-BA 含量为影响芽诱导的主要因素,MS + 6-BA 1 mg/L + KT 1 mg/L + NAA 1 mg/L 是最佳的芽诱导培养基。

2.3 生根培养结果 罗勒在离体培养过程中都体现良好的生根特性,在培养基 MS + 6-BA 1 mg/L + KT 0.5 mg/L + NAA 0.5 mg/L 上进行继代培养,已有部分小苗长出根系。在转入生根培养基 MS + 6-BA 1 mg/L + IBA 0.5 mg/L + NAA 0.5 mg/L 上培养 10 d 左右,则可获得健壮、发达的根系,并在距培养基表面 1 cm 左右处的茎段上长出白色气生根,生

根率达 95% 以上。

2.4 试管苗的移栽 当小苗长出 4~5 条,长约 1~2 cm 的健壮的根时,对其进行炼苗,并按上述方法移栽,成活率可达 80% 以上。

3 讨论

罗勒愈伤组织的诱导和培养可以为细胞培养及植株再生提供材料来源。在培养过程中发现,罗勒愈伤组织的颜色与生长素存在着紧密联系,由 2,4-D 诱导的罗勒愈伤组织其颜色多为白色,容易产生褐变;由 NAA 诱导的罗勒愈伤组织其颜色均为绿色,愈伤组织有较长的生长期,产生褐变的时间相对较迟。该研究已经成功地将由 NAA 诱导的绿色愈伤组织诱导再生植株。由 2,4-D 诱导的白色愈伤组织能否用于细胞培养,并从细胞培养中获得 B-芳樟醇等有效成分则有待进一步研究。

参考文献

- [1] 兰瑞芳,冯珊. 闽产罗勒油化学成分的研究[J]. 海峡药学,2001,13(1):51-52.
- [2] 曲迅,杨美香,郑广娟,等. 罗勒多糖对肿瘤转移行为的影响[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志,2004,11(1):31-35.
- [3] 祝丽香. 罗勒的研究与开发应用[J]. 北方园艺,2005(1):15-16.
- [4] 尹锋,胡立宏,楼凤昌. 罗勒化学成分的研究[J]. 中国天然药物,2004,2(1):20-23.
- [5] 周利辉. 罗勒的品种及其利用价值[J]. 蔬菜,1998(3):13.
- [6] 周绪霞,李卫芬. 罗勒的应用与展望[J]. 兽药与饲料添加剂,2003,8(2):25-26.
- [7] 汪涛,崔书亚,胡晓黎,等. 罗勒挥发油成分研究[J]. 中国中药杂志,2003,28(8):740-742.
- [8] 谢慧明,张文科,潘见. 超临界 CO₂ 萃取罗勒挥发油的工艺研究[J]. 食品科学,2003,24(11):53-56.
- [9] 吴冬乾,夏月明,朱玉萍. 罗勒的实用栽培技术[J]. 上海蔬菜,2005(2):39.
- [10] 蔡汉权,赖钟雄,林珊珊,等. 罗勒 (*Ocimum basilicum*) 悬浮细胞系的建立与保持[J]. 热带作物学报,2006,27(27):44-49.
- [11] 蔡汉权,赖钟雄,林珊珊,等. 罗勒原生质体的分离和纯化[J]. 江西农业大学学报,2006,25(4):529-534.
- [12] 蔡汉权. 罗勒的组织培养及快速繁殖[J]. 植物生理通讯,2005,41(3):347.

(上接第 6120 页)

3 讨论

试验表明,小麦、油菜幼苗可以吸收处理液中的 Cu²⁺,并在其体内各部分积累,积累量随 Cu²⁺ 浓度的增大而增加。小麦、油菜幼苗体内积累的 Cu²⁺ 越多,其生长受到的抑制作用就越大^[5]。这是因为 Cu²⁺ 胁迫下的小麦、油菜幼苗体内生理生化过程紊乱,光合作用降低,吸收受到抑制,导致供给它们生长的物质和能量减少。Cu²⁺ 主要积累在小麦、油菜幼苗的根部,向上运输的能力较弱^[6]。这是因为 Cu²⁺ 与植物作用时,最先接触到根部,根细胞壁中存在大量交换位点,能将 Cu²⁺ 固定在这些位点上,从而阻止 Cu²⁺ 进一步向地上部分转移。因此,根是植物最重要的络合 Cu²⁺ 的部位,也是最易受 Cu²⁺ 毒性影响的部位。

加入球形红细菌菌液后,小麦、油菜幼苗各部分铜积累都有所降低,生长受到的抑制也有所缓解。高浓度菌悬液可以更明显地降低 2 种幼苗体内积累的铜,也更有利于缓解 Cu²⁺ 对 2 种幼苗生长的抑制作用。这可能是因为:一是光合细菌为 G⁻ 原核生物,其细胞壁成分主要为肽聚糖,与

藻类不同,但同样带负电荷和氨基、羟基等官能团, Cu²⁺ 与球形红细菌菌液接触时,二者可以形成稳定的络合物^[7];二是球形红细菌通过同化型硫酸还原作用及脱硫酶作用生成硫化铜沉淀。白红娟等发现在菌体生长稳定期,部分半胱氨酸及其衍生物通过半胱氨酸脱硫酶作用生成 S²⁻,将 Cu²⁺ 转化为沉淀 CuS。因此,球形红细菌就可以减少环境中小麦、油菜直接吸收的 Cu²⁺,从而降低了小麦、油菜体内各部分铜的积累,减轻 Cu²⁺ 对它们的损伤。

参考文献

- [1] 廖自基. 环境中微量重金属元素的污染危害及迁移转化[M]. 北京:科学出版社,1989.
- [2] ALVA A K, CHEN E Q. Effects of external copper concentrations on uptake of trace elements by citrus seedlings[J]. Soil Sci, 1995(159):59-64.
- [3] 沈振国,陈怀满. 土壤重金属污染生物修复的研究进展[J]. 农村生态环境,2000,16(2):39-44.
- [4] 熊琦,冯安吉,刘继彪,等. 光合细菌促进菠菜生长的机理研究[J]. 应用与环境生物学报,1999,5(S1):194-196.
- [5] SRIVASTAVA P C, GUPTA U C. Trace elements in crop production[M]. Lebanon: Science Publishers Inc, USA, 1996.
- [6] 韩梅,李发生,卢桂兰,等. 外源 Cd 胁迫对不同类型土壤中蔬菜生长的影响及其残留效应[J]. 农业环境科学学报,2004,23(2):213-216.
- [7] 周茂洪,赵肖为,周峙苗. 几种重金属离子对光合细菌生长的抑制效应[J]. 生态学杂志,2002,21(4):6-11.