

## 罗勒离体培养植株再生体系的建立<sup>\*</sup>

邓明华<sup>1</sup>, 文锦芬<sup>2</sup>, 赵 凯<sup>1</sup>, 丁 燕<sup>1</sup>, 夏家红<sup>1</sup>, 毛映勇<sup>1</sup>

(1. 云南农业大学园林园艺学院, 云南 昆明 650201; 2. 昆明理工大学现代农业工程学院, 云南 昆明 650224)

**摘要:** 以6个罗勒品种为材料, 研究不同激素(6-BA, KT, ZT, NAA)组合对植株再生的影响。结果表明在6种基因型中, 甜罗勒的效果最好; 罗勒不定芽诱导的最佳培养基组合为MS + ZT 0.4 mg/L + KT 0.1 mg/L + 6-BA 0.2 mg/L + NAA 0.02 mg/L。罗勒不定芽伸长的最佳培养基组合为MS + ZT 0.4 mg/L + KT 0 mg/L + 6-BA 0.2 mg/L + NAA 0.04 mg/L。适合于不定芽生根的不定根诱导培养基组合为1/2MS + IAA 0.2 ~ 0.3 mg/L。

**关键词:** 罗勒; 组织培养; 植株再生; 正交实验

**中图分类号:** S 567.219.035.3   **文献标识码:** A   **文章编号:** 1004-390X (2008) 05-0658-05

## Establishment of in Vitro Plant Regeneration System in *Ocimum basilicum* L.

DENG Ming-hua<sup>1</sup>, WEN Jin-fen<sup>2</sup>, ZHAO Kai<sup>1</sup>, DING Yan<sup>1</sup>, XIA Jia-hong<sup>1</sup>, MAO Ying-yong<sup>1</sup>

(1. Faculty of Horticulture and Landscape, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

2. Faculty of Modern Agricultural Engineering, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650224, China)

**Abstract:** Six basil cultivars were used as the experimental materials and the effects of different combinations of phytohormones (6-BA, KT, ZT, NAA) in orthogonal test on the plant regeneration of basil were studied. The results indicated that the best genotype was sweet basil among the 6 genotypes; the optimal concentration for inducing adventitious buds was MS + ZT 0.4 mg/L + KT 0.1 mg/L + 6-BA 0.2 mg/L + NAA 0.02 mg/L; Adventitious buds elongated well on MS + ZT 0.4 mg/L + KT 0 mg/L + 6-BA 0.2 mg/L + NAA 0.04 mg/L. The optimized medium for inducing root was 1/2MS + IAA 0.2 ~ 0.3 mg/L.

**Key words:** *Ocimum basilicum* L.; tissue culture; plant regeneration; orthogonal test

罗勒 (*Ocimum basilicum* L.) 是唇形科罗勒属的变种, 俗名毛罗勒、零陵香、兰香、千层塔、九层塔、香草, 也称防馊香菜、驱蚊草, 是唇形科罗勒属一年生草本植物<sup>[1-3]</sup>。罗勒在世界许多国家均有分布, 通常作为医疗用品和香辛调味料来种植, 是一种食药兼用的资源植物<sup>[4-9]</sup>。近年来, 随着人们绿色环保认识的提高, 罗勒日益成为国内外医疗保健、食品、化工领域的研究热点<sup>[10-15]</sup>。罗勒原产于印度及埃及, 16世纪前后

由印度传到欧洲。全球栽培面积为 10 000 hm<sup>2</sup>, 广泛栽培于地中海沿岸地区、瓜哇、西塞尔、留尼旺群岛、佛罗里达及摩洛哥等。在中国有 1 400 年的栽培历史, 分布较广, 主产于河北、华东、华中等地。

近年来更是在临床、药理、化学和生药的研究上取得了很大的进展<sup>[10,13,15]</sup>。由于工业需求的不断增长, 大量的野生资源被消耗, 因此罗勒的人工种植和栽培受到普遍重视, 利用组织培养的

收稿日期: 2008-01-08   修回日期: 2008-02-18

<sup>\*</sup> 基金项目: 云南省自然科学基金 (2005C0023Q); 云南省教育厅青年科学研究基金 (04Y559B, 07Y11682)

作者简介: 邓明华 (1974-), 男, 湖南临湘人, 硕士, 讲师, 主要从事园林园艺研究。

E-mail: dengminghua1974@yahoo.com.cn

方法可以在短时间内生产大量的优质种苗, 同时还可以为罗勒的生理生化、遗传转化的工作提供帮助<sup>[11,12,14]</sup>。本文利用甜罗勒、大叶紫罗勒、莴苣叶形罗勒、茴芹香味罗勒、矮生罗勒、绿罗勒等6个不同基因型罗勒幼嫩的叶片, 研究基因型和激素不同组合对罗勒再生的影响, 试图建立高效的罗勒离体培养植株再生体系。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

试验材料为种植在温室中的甜罗勒、大叶紫罗勒、莴苣叶形罗勒、茴芹香味罗勒、矮生罗勒、绿罗勒。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 无菌材料的获得

取生长在温室中、生长健壮、无病虫害的1.1所述的6种不同基因型的罗勒幼嫩叶片各15片, 用自来水冲洗10 min左右, 用75%的酒精灭菌10 s, 然后放入0.1%的 $\text{HgCl}_2$ 中灭菌7 min, 再用无菌水冲洗4~5遍, 放入无菌烧杯中备用。

#### 1.2.2 培养基的配制

不定芽诱导和伸长培养基: 以MS为基本培养基, 添加一定浓度的6-苄基氨基嘌呤(6-BA) (0 mg/L, 0.1 mg/L, 0.2 mg/L)、激动素(KT) (0 mg/L, 0.1 mg/L, 0.2 mg/L)、玉米素(ZT) (0 mg/L, 0.4 mg/L, 0.8 mg/L)、和萘乙酸(NAA) (0 mg/L, 0.02 mg/L, 0.04 mg/L) 采用 $L_9(3^4)$ 正交设计<sup>[16]</sup>。

生根培养基: 以1/2MS为基本培养基, 添加一定浓度的NAA (0 mg/L, 0.1 mg/L, 0.2 mg/L, 0.3 mg/L, 0.4 mg/L, 0.5 mg/L)。

各培养基添加30 g/L的蔗糖, 7.5 g/L的琼脂, 调节pH值为5.8, 121 °C高压灭菌20 min, 冷却后备用。

#### 1.2.3 不定芽的诱导和伸长

取1.2.1已经灭菌的叶片, 切去叶缘和叶柄, 再切成0.5 cm × 1.0 cm大小, 叶背朝下, 接种到不定芽诱导和伸长培养基上, 每瓶4~6个, 9次重复。15 d继代1次, 30 d统计不定芽的分化率。以筛选出的高效不定芽分化培养基上分化的不定芽进行不定芽的伸长试验。得到丛芽后, 将丛芽分割, 去掉无芽的外植体, 转移到玻璃瓶中的新鲜培养基上。15 d继代1次。30 d统计伸长

不定芽数。

#### 1.2.4 不定芽的生根和移栽

待不定芽伸长约2~3 cm以上, 从基部切下, 放于生根培养基中诱导不定根的产生, 20 d后统计生根情况。待长出完整根系后, 敞瓶炼苗7~10 d, 然后洗净根系培养基, 用适当浓度的多菌灵浸泡后, 移栽于经过灭菌的基质中, 浇1/2MS无激素液体培养基, 用塑料膜覆盖保湿, 15 d后敞膜, 移入温室中常规管理, 10 d后统计成活率。

#### 1.2.5 培养条件

本试验培养条件设定为: 光照强度为2500 lx左右, 光照温度为 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ , 黑暗温度为 $(23 \pm 1)^\circ\text{C}$ , 光照时间14 h/d。

#### 1.2.6 结果分析

实验结果利用DPS分析软件进行差异显著性分析。

## 2 结果与分析

外植体在接种5 d左右开始膨大, 10 d左右边缘长出愈伤组织, 20 d左右开始分化出不定芽, 30 d后多数培养基有不同数量的外植体有不定芽的分化。

### 2.1 不同基因型对不定芽诱导与伸长的影响

将6个供试材料的叶片外植体接种于不定芽诱导和伸长培养基MS+6-BA 0.2 mg/L+KT 0.1 mg/L+ZT 0.4 mg/L+NAA 0.02 mg/L上。30 d后, 不定芽的诱导频率(甜罗勒、大叶紫罗勒、莴苣叶形罗勒、茴芹香味罗勒、矮生罗勒、绿罗勒)分别为90.0%, 75.5%, 76.5%和54.2%, 77.6%, 80.0%, 平均每个叶片上伸长的不定芽数分别为5.4, 3.1, 4.8, 5.3, 5.0和4.8个(数据未列出), 甜罗勒最高。基因型间存在较为显著的差异。



图1 不定芽的诱导

Fig. 1 Inducement of adventitious buds

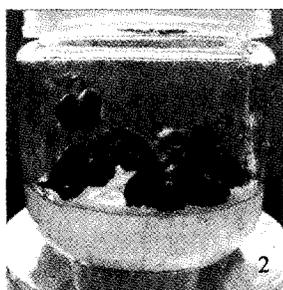


图 2 不定芽的伸长

Fig. 2 Elongation of adventitious buds

## 2.2 激素及其配比对不定芽的诱导和伸长的影响

将甜罗勒叶片接种到不定芽诱导和伸长培养基上, 30 d 后观察不定芽的诱导情况和 60 d 后观察不定芽得伸长情况 (图 1, 2)。

### 2.2.1 激素及其配比对不定芽诱导的影响

不同激素及其配比对罗勒不定芽诱导和伸长影响的正交试验结果见表 1。由表 1 不定芽诱导率的 R 值分析可以看出, 4 种激素对不定芽诱导率的影响从大到小依次为 6-BA, ZT, KT 和 NAA。对影响不定芽诱导率各因子的 K 值进行分析, 结果显示: NAA, KT, ZT 和 6-BA 的浓度分别为 0.02 mg/L, 0.1 mg/L, 0.4 mg/L 和 0.2 mg/L 时, 相应 K 值最大; 之后进行了不同水平的激素对罗勒不定芽诱导率平均数间的显著性多重比较 (见表 2), 结果与 K 值表现一致。所以就不定芽诱导率这一指标而言, 通过对试验结果进行正交分析以及多重比较, 可以确定不定芽诱导的最佳条件为 MS + ZT 0.4 mg/L + KT 0.1 mg/L + 6-BA 0.2 mg/L + NAA 0.02 mg/L。

表 1 罗勒不定芽诱导与伸长培养基中激素配比的正交试验结果 [ $L_9(3^4)$ ]Tab. 1 Results of orthogonal test of different concentrations of phytohormones in medium for inducing and elongating adventitious buds of *Ocimum basilicum* L. [ $L_9(3^4)$ ]

编号 No.	激素配比/ ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) hormone combination				外植 体数 number of explants	分化外 植体数 number of differentiation explants	诱导率 / % inducing rate	平均每个外植 伸长不定芽数 average number of elongating adventitious buds per explants	不定芽诱导率/% inducing rate of adventitious buds				平均每个外植体 上伸长不定芽数 average number of elongating adventitious buds per explants			
	NAA	KT	ZT	6-BA					K1	K2	K3	R	K1	K2	K3	R
1	0	0	0	0	45	0	0	165.0	158.1	170.0	151.4	10.2	16.1	8.4	11.7	
2	0	0.1	0.4	0.1	48	43	90.0	250.6	246.3	264.1	239.1	17.7	16.2	18.9	16.1	
3	0	0.2	0.8	0.2	52	39	75.0	228.9	240.1	210.4	254.0	18.5	14.7	19.1	18.6	
4	0.02	0	0.4	0.2	51	48	94.1	28.5	29.4	31.4	34.2	2.8	0.5	3.6	2.3	
5	0.02	0.1	0.8	0	49	35	71.4									
6	0.02	0.2	0	0.1	47	40	85.1									
7	0.04	0	0.8	0.1	50	32	64.0									
8	0.04	0.1	0	0.2	53	45	84.9									
9	0.04	0.2	0.4	0	50	40	80.0									

表 2 罗勒不定芽诱导率平均数间的方差分析表

Tab. 2 Variance analysis of inducing rate of adventitious buds of *Ocimum basilicum* L.

	激素配比 hormone combination			
	NAA	KT	ZT	6-BA
K1	165.0 c C	158.1 c C	170.0 c C	151.4 c C
K2	250.6 a A	246.3 a A	264.1 a A	239.1 b B
K3	228.9 b B	240.1 b B	210.4 b B	254.0 a A

注: a, b, c 代表显著水平, A, B, C 代表极显著水平, 表 3 同。

Note: a, b and c mean significant level; A, B and C mean extremely significant level; the same as Tab. 3.

### 2.2.2 激素及其配比对每外植体上平均伸长的不定芽数的影响

在上述 9 种培养基上诱导的不定芽伸长情况见表 1。从表 1 中每外植体上平均伸长的不定芽数的 R 值的大小可以发现: 不同激素对每外植体上平均伸长的不定芽数的影响不同, 其影响的大小依次为 ZT, NAA, 6-BA 和 KT, 而且当其浓度分别为 0.8 mg/L, 0.04 mg/L, 0.2 mg/L 和 0.1 mg/L 时, 影响最大。得出初步结论后进行了不同水平的激素对罗勒每个外植体上伸长不定芽数平均数间的显著性多重比较 (见表 3), 结果与初步结论一致。由此, 就每外植体上平

均伸长的不定芽数这一指标而言, 通过对试验结果进行正交分析以及多重比较, 发现 KT 在 K1 和 K2 水平之间无显著性差异, ZT 在 K2 和 K3 之间达到显著性差异, 但未达到极显著差异。可以确定不定芽伸长的最佳条件为 MS + ZT 0.8 mg/L + KT 0 mg/L + 6-BA 0.2 mg/L + NAA 0.04 mg/L。

表3 罗勒每个外植体上伸长不定芽数  
平均数间的显著性多重比较

Tab.3 Variance analysis of elongating adventitious buds per explant of *Ocimum basilicum* L.

	激素配比 hormone combination			
	NAA	KT	ZT	6-BA
K1	10.2 c C	16.1 a A	8.4 c B	11.7 c C
K2	17.7 b B	16.2 a A	18.9 b A	16.1 b B
K3	18.5 a A	14.7 b B	19.1 a A	18.6 a A

### 2.3 不定根的诱导

将伸长到 2~3 cm 的不定芽, 从基部切下, 转移到不定根诱导培养基, 有大不定根的产生。比较了生长素 NAA 的不同浓度对不定根的诱导及不定根的质量的影响, 结果表明: 添加 NAA 的不定根诱导培养基都能诱导不定根的产生。只是不定根的诱导率和不定根的质量差异较大 (数据未列出)。其中以 1/2MS + IAA 0.2-0.3 mg/L 的培养基诱导的不定根系健壮、须根丰富、且诱导率也高 (图3)。IAA 的浓度低于 0.2 mg/L 时, 产生的不定根十分纤细、易断, 不利于移栽; 而 IAA 的浓度高于 0.3 mg/L 时, 产生的不定根粗短, 为鸡爪根, 移栽成活率低。

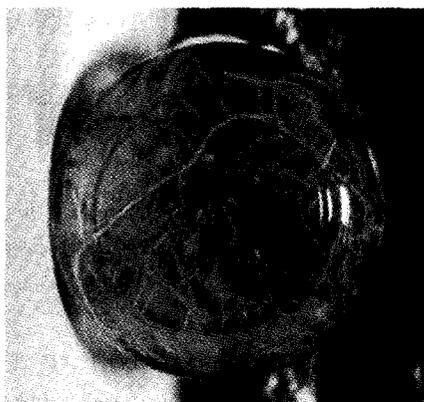


图3 不定芽的生根

Fig.3 Adventitious bud rooting

### 2.4 试管苗的移栽

将已经长出完整根系的罗勒试管苗, 敞瓶炼苗 7~10 d 后, 洗净根系的培养基, 浸泡于适当浓度的多菌灵溶液中 4~5 s 后, 移栽于经过灭菌的蛭石中, 浇 1/2MS 无激素液体培养基, 塑料膜保湿 15 d 后, 敞开膜。移入温室, 10 d 后成活率达 90% 以上 (图4)。



图4 定植后的组培苗

Fig.4 Tissue seedling planting

## 3 讨论

### 3.1 基因型对植物组织培养的影响

在植物组织培养中, 不同基因型植株在同一浓度激素诱导下, 其产生效果表现不一。本试验对 6 种基因型罗勒进行不定芽的诱导和伸长。结果表明, 甜罗勒不定芽诱导率明显高于另外 3 种罗勒, 不定芽诱导率为 90.0%, 平均每个外植体上伸长不定芽数也为最多, 为 5.4 个。试验表明, 在相同浓度激素诱导下, 不同基因型罗勒, 其表现结果有明显差异。

### 3.2 激素对试验结果的影响

在植物组织培养中, 激素的种类、浓度及其配比对试验结果有相当大的影响。本试验采用正交设计试验方式, 能够在传统的单因子比较分析的基础上, 容纳更多的因素和水平, 同时大大减少试验的次数, 提高准确率。本研究结果表明, 6-BA 对罗勒叶片培养过程中不定芽的诱导影响最大, 适合浓度为 0.2 mg/L, 其余影响罗勒不定芽诱导的激素依次为 ZT, KT 和 NAA, 浓度分别为 0.4 mg/L, 0.1 mg/L 和 0.02 mg/L; 影响罗勒不定芽伸长的激素依次为 ZT, NAA, 6-BA 和 KT, 而且当其浓度分别为 0.8 mg/L, 0.04 mg/L, 0.2 mg/L 和 0.1 mg/L 时, 影响最大。经过对试验结果进行正交分析以及多重比较后, 确定罗勒不定芽诱导的最佳培养基配比为 MS + ZT 0.4 mg/L + KT 0.1 mg/L

+6-BA 0.2 mg/L + NAA 0.02 mg/L。罗勒不定芽伸长的最佳培养基配比为 MS + ZT 0.4 mg/L + KT 0 mg/L + 6-BA 0.2 mg/L + NAA 0.04 mg/L。

#### [参考文献]

- [1] 张吉通. 食用香味植物——罗勒 [J]. 吉林农业, 2002, (12): 28.
- [2] 吕友东. 甜罗勒无公害栽培技术 [J]. 农家科技, 2006, (4): 10.
- [3] 祝丽香. 罗勒的研究与开发应用 [J]. 北方园艺, 2005, (1): 15-16.
- [4] 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.
- [5] 于忠香. 洋味野菜——甜罗勒 [J]. 上海蔬菜, 2004, (6): 19.
- [6] 张吉通. 食用香味植物——罗勒 [J]. 北方园艺, 2003, (3): 82.
- [7] 肖英华, 谢海, 熊丽. 罗勒的性状与形态组织鉴定 [J]. 中药材, 2004, 27 (3): 169-171.
- [8] 黄奕怡, 徐东升, 陈建才. 芳香植物“罗勒”新品种栽培技术初报 [J]. 上海农业科技, 2003, (3): 95-96.
- [9] 毛同艳, 刘淑平, 李文阁. 罗勒露地栽培技术与利用 [J]. 种子世界, 2003, (10): 28-29.
- [10] 郭文菁, 杨美香, 曲迅, 等. 罗勒多糖对树突状细胞表面分子表达的影响 [J]. 中国免疫学杂志, 2006, 22 (9): 827-829.
- [11] 蔡汉权, 赖钟雄, 林珊珊. 罗勒 (*Ocimum basilicum*) 原生质体的分离和纯化 [J]. 江西农业大学学报, 2006, 28 (4): 529-533.
- [12] 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 (1): 44-48.
- [13] 帕丽达, 米仁沙, 丛媛媛, 等. 新疆罗勒挥发油的化学成分研究 [J]. 中草药, 2006, 37 (3): 352.
- [14] 蔡汉权. 罗勒的组织培养和快速繁殖 [J]. 植物生理学通讯, 2005, 41 (3): 347.
- [15] 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): 20-24.
- [16] 刘权, 马宝琨, 吕均良, 等. 果树试验设计及统计 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.

#### (上接第 637 页)

- [7] KADIM I T, MAHGOUB O, AL-AJMI D S, et al. An evaluation of the growth, carcass and meat quality characteristics of Omani goat breeds [J]. Meat Science, 2003, 66: 203-210.
- [8] DHANDA J S, TAYLOR D G, MCCOSKER J E. The influence of goat genotype on the production of Capretto and Chevon carcasses. 1. Growth and carcass characteristics [J]. Meat science, 1999, 52: 355-361.
- [9] OMAN J S, WALDRON D F, GRIFFIN D B. Effect of breed-type and feeding regimen on goat carcass traits [J]. Journal of Animal Science, 1999, 77: 3215-3218.
- [10] OMAN J S, WALDRON D F, GRIFFIN D B. Carcass traits and retail display-life of chops from different goat breed types [J]. Journal of Animal Science, 2000, 78: 1262-1266.
- [11] WARRISS P D. Meat Science: An introductory text [M]. CABI Publishing. UK. 2000.
- [12] BAÑÓN S, VILA R, PRICE A, et al. Effects of goat milk or milk replacer diet on meat quality and fat composition of suckling goat kids [J]. Meat Science, 2006, 72: 216-221.
- [13] 陈明造. 肉用家畜的脂肪生物学 [M]. 台北: 现代畜牧杂志社, 1973.
- [14] 张英华. 肉的品质及其相关质量指标 [J]. 食品研究与开发, 2005, 26 (1): 39-42.
- [15] KING D A, VOGES, K L, HALE D S, et al. High voltage electrical stimulation enhances muscle tenderness, increases aging response, and improves muscle color from cabrito carcasses [J]. Meat Science, 2004, 68: 529-535.
- [16] 陈韬, 谭丽勤, 范江平, 等. 放牧条件下圭山山羊产肉性能及肉质特性 [J]. 云南畜牧兽医, 1996, (4): 12-13.
- [17] 陈韬, 范江平, 葛长荣. 放牧条件下云岭山羊屠宰性能及肉质 [J]. 云南农业大学学报, 1999, 15 (1): 58-62.
- [18] SEN A R, SANTRA A, KARIM S A. Carcass yield, composition and meat quality attributes of sheep and goat under semiarid conditions [J]. Meat Science, 2004, 66: 757-763.
- [19] MARTÍNEZ-CEREZO S, SANUDO C, PANEA B, et al. Breed, slaughter weight and ageing time effects on physico-chemical characteristics of lamb meat [J]. Meat Science, 2005, 69: 325-333.