

## Preliminary Study on Autotetraploid Mutagenesis of Medicinal Plant *Ocimum basilicum*

Xiaoying Guo<sup>1</sup>, Na Yang<sup>2</sup>, Yuxiang Wu<sup>2\*</sup>, Xiaoming Zhao<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Hydraulic Engineering, Tianjin Agricultural University, Tianjin

<sup>2</sup>College of Agriculture, Shanxi Agricultural University, Taigu

Email: \*[wuyuxiang89@sina.com](mailto:wuyuxiang89@sina.com)

Received: Nov. 28<sup>th</sup>, 2013; revised: Dec. 17<sup>th</sup>, 2013; accepted: Jan. 2<sup>nd</sup>, 2014

Copyright © 2013 Xiaoying Guo et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. In accordance of the Creative Commons Attribution License all Copyrights © 2014 are reserved for Hans and the owner of the intellectual property Xiaoying Guo et al. All Copyright © 2014 are guarded by law and by Hans as a guardian.

**Abstract:** The seedling apical bud of *Ocimum basilicum* was painted with colchicine semi-solid in this research. We focused on the best duration time of colchicine and agar on autotetraploid mutagenesis of this medical plant. The result showed that 0.2% colchicine conducted on *O. basilicum* for 72 h with the highest mutation rate at 32%. Compared to the controls, the mutants had much shorter internodes, more stocky plants, bigger and thicker cotyledons which stayed longer than controls, inhibited growth, delayed euphylla, asymmetrical crimped and darker green leaves, different leaf division and curled, spoon-like leaves. According to the statistical analysis, there are highly significant differences between the control and the induced plant in the following aspects: lower height, shorter first internode distance, thicker stem, smaller leaf index, higher chlorophyll content, thicker leaf, less stomata number of epidermis under the first true leaf per unit area, more chloroplasts per stoma and smaller length-width ratio of stoma. It was tested that the mutation was successful for this medical plant. It needs further research for cytogenetic identification and character stability.

**Keywords:** *Ocimum Basilicum*; Polyploid Breeding; Colchicine

## 药用植物罗勒同源多倍体诱变的初步研究

郭小英<sup>1</sup>, 杨娜<sup>2</sup>, 吴玉香<sup>2\*</sup>, 赵晓明<sup>2</sup>

<sup>1</sup>天津农学院水利工程系, 天津

<sup>2</sup>山西农业大学农学院, 太谷

Email: \*[wuyuxiang89@sina.com](mailto:wuyuxiang89@sina.com)

收稿日期: 2013年11月28日; 修回日期: 2013年12月17日; 录用日期: 2014年1月2日

**摘要:** 采用秋水仙碱琼脂凝胶涂抹法, 处理罗勒(*Ocimum basilicum*)幼苗茎尖生长点, 研究罗勒同源四倍体种质创新的最佳诱变时间。实验证明, 0.2%的秋水仙碱诱变72 h, 诱变率最高, 为32%。和对照株形态比较得知, 诱变株矮壮, 节间缩短; 子叶大且肥厚, 脱落时间延迟; 生长发育受抑制; 真叶出现晚, 叶形不对称, 叶面凹凸不平, 出现卷曲叶、勺状叶等变异; 叶色浓绿。统计学分析表明, 诱变株较对照株, 株高显著降低, 第一节间距显著缩短, 茎秆显著增粗, 叶形指数显著减小, 叶绿素含量显著升高, 叶片厚度显著增加, 第一真叶下表皮单位面积气孔数显著减少, 每气孔叶绿体数显著增多, 气孔长宽比显著减小。从诱变株与对照株的初步形态变异表明, 罗勒的多倍体诱变是成功的, 诱变株的细胞学鉴定和性状稳定还有待于进一步的研究。

\*通讯作者。

**关键词:** 罗勒; 同源多倍体育种; 秋水仙碱

## 1. 引言

罗勒(Herb of Sweet Basil)<sup>[1]</sup>, 又名兰香, 翳子草, 千层塔, 家佩兰, 苏薄荷, 野金砂, 省头草。一年生直立草本, 全体芳香, 分布广泛。是我国传统中药之一。罗勒子: 甘辛, 凉平。归肺、脾、胃、大肠经。疏风解表, 化湿和中, 行气活血, 解毒消肿。

药用植物是我国中医药事业的原材料, 其质量的优劣直接影响中药系列产品的质量和疗效。药用植物大多以根、茎和叶等器官为收获对象, 其染色体加倍后, 根、茎、叶巨型化, 较好地满足了药材生产的要求; 且倍性变化往往能导致次生代谢产物的含量变化, 有可能获得有效成分含量高的药用植物新品种。怀牛膝同源四倍体中蜕皮激素较原植物高出达 10 倍之多<sup>[2]</sup>; 白术同源四倍体过氧化物酶含量高于二倍体植株<sup>[3]</sup>。但染色体倍性的增加与化学成分含量的变化并不成正比关系, 且有的可能会较原植物产生新的性状和新的化学成分<sup>[4]</sup>。在漫长的进化过程中, 多倍体由于基因的剂量效应, 也即细胞核内染色体组的增加, 使多倍体植物对不良环境的抵抗能力也比二倍体强<sup>[5]</sup>。多倍体植株一般较矮、茎秆粗壮, 故能较好地抗倒伏, 有的还具有抗旱、抗病等其他特性。这对扩大种植区域, 提高产量及野生品种驯化极为有利。多倍体药用植物的巨型性, 抗逆性强, 药用成分含量高等特性, 正是药材优质、高产育种所期望达到的目标。

目前生态环境遭到严重破坏, 药用植物栽培品种品质退化, 野生药用植物资源逐渐减少, 以致枯竭, 加强药用植物多倍体培育, 可以缓解这些矛盾, 甚至从根本上解决问题。因此, 多倍体诱导技术应用于药用植物具有深远的意义。

## 2. 材料和方法

### 2.1. 试验材料

罗勒(*Ocimum basilicum*)属于唇形科(*Labiatae*)罗勒属(*Ocimum* Linn.)<sup>[6]</sup>。种子来源: 山西天然药用植物研究所。

### 2.2. 试验方法

1) 制作阳畦; 配制营养土: 腐熟的厩肥与无菌

壤土(1:2); 装营养钵; 配制试剂: 0.08%的营养液(去离子水 20 ml, 尿素 6 mg, 磷酸 10 mg); 制备凝胶: 0.2%秋水仙碱 + 1%琼脂凝胶; 播种: 凉水浸种 24 h, 每营养钵播种 2 粒种子, 覆土 1 cm。

2) 诱变处理: 营养钵中的罗勒出土后, 待其子叶展开顶端分生组织刚刚开始萌动时, 挑取一滴加热溶解的秋水仙碱琼脂凝胶(约 35℃)滴于顶芽上, 充分包裹顶芽和子叶柄基部, 并用罩杯罩住处理后的幼苗。分别处理 24 h、48 h、72 h, 即滴一次、二次、三次, 并设置对照。处理结束后取掉罩杯, 待秋水仙碱琼脂凝胶充分干燥后, 用尖镊子轻轻撕掉顶芽和子叶柄基部的秋水仙碱琼脂凝胶残余物, 以此来精确控制诱变时间。在幼苗恢复生长 1 至 2 周后, 喷洒营养液和清水, 促进生长, 然后移栽到大田。

3) 观察苗期处理植株和对照植株的生长状况, 依据生长受阻、叶色浓绿、叶片皱缩、植株畸形等指标对得到的诱变株进行筛选和鉴定。分别取 7 株不同处理时间下明显变化的罗勒植株与对照株, 记录其株高、第一真叶叶型指数、第一节间距、茎秆粗。

4) 叶片厚度测量: 摘取诱变组与对照组第一真叶各 5 片, 装进保鲜袋带回实验室。用刀片各切下一段叶片, 将其立在载玻片上, 用 Olympus BX51 显微镜观察记录其叶片厚度。

5) 气孔及叶绿体观察: 用镊子轻轻撕下叶片下表皮, 在干净的载玻片上展平, 滴加一滴 1%I-KI 染液, 盖上盖玻片, 静置 5 min; 待充分染色后, 将其置于显微镜下观测单位面积气孔数、气孔长与宽以及保卫细胞中叶绿体数。观测结果各取 5 组数据, 并以此为基础利用 Excel 软件进行显著性测验<sup>[7]</sup>。

## 3. 结果与分析

植物多倍体的鉴定方法很多, 以植株外形观察为基础, 气孔形态观察、叶绿体计数为辅助可以初步进行鉴别。与二倍体比较, 诱变株矮壮, 节间缩短; 子叶大且肥厚, 脱落时间延迟; 生长发育受抑制; 真叶出现晚, 叶形不对称, 叶面凹凸不平, 出现卷曲叶、勺状叶等变异; 叶色浓绿。

对 0.2%秋水仙碱琼脂糖凝胶不同处理时间下罗勒的诱变效果进行分析(见表 1), 得出最佳处理时间为

**Table 1. Inducing effect of colchicine on *O. basilicum* in different treatment time**  
**表 1. 不同时间下秋水仙碱处理罗勒的诱变率比较**

诱变时间	处理株数	存活株数	诱变成功数	存活率	诱变率
72 h	50	32	16	64.00%	32.00%
48 h	46	28	7	60.87%	15.22%
24 h	26	13	7	50.00%	26.92%
0 h(对照)	11	11	-	100.00%	-

72 h, 其诱变率可达 32.00%; 处理时间 24 h 效果次之, 诱变率达 26.92%; 处理 48h 诱变率最低, 为 15.22%。

用 Dunnett 最小显著差数法对罗勒诱变株与对照株的形态学指数差异进行统计学分析(见表 2)。结果表明, 诱变组较对照组株高极显著降低, 第一节间距极显著缩短, 茎秆粗极显著增加, 叶形指数极显著减小, 叶绿素含量极显著升高, 叶片厚度极显著增加, 第一真叶下表皮单位面积气孔数极显著减少, 每气孔叶绿体数极显著增多, 气孔长宽比极显著减小; 不同处理时间下诱变株之间, 株高、第一节间距、茎秆粗、叶形指数、叶绿素含量、叶片厚度、第一真叶下表皮单位面积气孔数、每气孔叶绿体数、气孔长宽比均无显著差异。说明与对照组比, 诱变组生长受阻, 植株外部形态发生明显的变异, 通过初步形态学特征得知, 获得的罗勒诱变株是多倍体。

#### 4. 讨论

随着药用植物资源紧缺的加剧, 药用植物多倍体新品种将以其速生、优质以及高抗逆性等特性, 在生产实践中得到重视, 而现代生命科学技术的进步也必将逐一解决相关的限制性难题, 使药用植物多倍体育种焕发出新的生机与活力。可以预见, 建立在现代遗传学以及细胞染色体工程技术基础之上的药用植物多倍体育种, 将随着人类对其应用价值认识的提高以及有关技术方法的注入而全面步入实用化程度, 从而带动未来药用植物的持续、高效发展。

在对育成多倍体材料进行鉴定时, 整个生长期均可以外部形态, 如生长受阻、叶色浓绿、植株畸形、叶片皱缩等特征来判断, 这是初步鉴定是否为多倍体的最简单、最直观的方法<sup>[8,9]</sup>。1) 生长受阻, 由于秋水仙碱是一种阻止细胞纺锤丝形成的细胞毒物, 所以当试验株在受到秋水仙碱处理后很快停止生长, 很多由于毒害作用造成植株死亡, 另一些在秋水仙碱处理

因素去掉后缓慢的恢复生长, 然后才逐渐的恢复到加速度生长过程, 使植株生长不正常, 导致生长受阻。2) 叶色浓绿, 植株的绿色深浅与其叶绿素的含量有关。叶绿体基因虽然是独立遗传的, 但它不是完全独立于核基因系统之外, 核染色体加倍后由于基因的剂量效应使叶绿体基因加倍, 从而导致植株的叶色浓绿。3) 植株畸形, 植物细胞的方向性与有丝分裂器的形成有关, 在秋水仙碱处理有丝分裂细胞中期时由于它阻止蛋白质亚基累积到已经形成的纺锤丝上, 阻止有丝分裂器的形成, 严重干扰有丝分裂时两极位置的确立。此外, 细胞对地磁场、地球重力场感知发生混乱, 最终造成细胞形态建成时的紊乱, 表现在宏观上就是植株畸形。4) 叶片皱缩, 秋水仙碱只对中期细胞的纺锤丝起作用, 对其他时期只有毒害作用, 那么在秋水仙碱处理的一个或长或短的细胞周期中非全部细胞被加倍成多倍体, 这些未加倍细胞只是受到了毒害, 待毒害消除后恢复生长。所以所处理的材料就会发生多倍体和二倍体细胞的混杂, 但是多倍体细胞生长速率要比二倍体细胞缓慢得多, 这样秋水仙碱处理的植株经过一段时间的生长后其叶片就会发生皱缩。5) 多倍体气孔比二倍体气孔大, 每视野中气孔数多倍体少于二倍体。

选取 0.2% 琼脂凝胶作为诱变剂, 该实验具有操作过程简便、处理时期集中、药剂浓度和处理时间可精确控制、药剂用量少、成本低等优点。处理过程中, 遇到降温, 这可能是导致 48 h 处理的诱变率偏低的原因。较低温度下二倍体细胞较四倍体细胞分生快, 植物组织会发生回复变异, 回复到以二倍体细胞为主的状态。实践证明, 不同的物种诱导方法不一样, 效果差异较大, 因为不同的材料对处理方式的敏感性不一样, 针对不同的药用植物, 应该进一步深入系统地研究有效的多倍体诱导方法。诱变株是第一代诱变材料, 大多数为嵌合体, 有待于进一步的细胞学鉴定和

**Table 2. Morphology comparison and statistic analysis of *O. basilicum* between mutants and controls**  
**表 2. 罗勒诱变株与对照株形态学比较及统计分析**

处理时间	株高/cm	第一节 间距/cm	茎秆粗/cm	叶型指数	叶绿素含量	叶片厚/ $\mu\text{m}$	单位面积 气孔数	每气孔叶 绿体数	气孔长/宽	
诱 变 组	72 h	1.22 bB	0.01 bB	0.25 aA	1.05 bB	34.6 aA	1020 aA	10.6 bB	31.8 aA	1.46 aA
	48 h	1.66 bB	0.20 bB	0.24 aA	1.21 bB	32.8 aA	1009 aA	10.6 bB	31.7 aA	1.43 aA
	24 h	1.30 bB	0.16 bB	0.23 aA	1.08 bB	32.1 aA	1017 aA	10.5 bB	31.7 aA	1.48 aA
对 照 组	0 h	6.28 aA	2.79 aA	0.15 bB	1.56 aA	32.0 bB	484 bB	22.6 aA	13.8 bB	1.29 bB

注: A、B 代表差异达到 1% 极显著水平, a、b 代表差异达到 5% 显著水平。(Note: Capital letters stand for significance at 0.01 level and small letters stand for significance at 0.05 level.)

自交纯合等性状稳定研究。

## 5. 结论

本研究用 0.2% 浓度的秋水仙碱琼脂凝胶对罗勒进行多倍体诱变, 最佳处理时间为 72 h, 其诱变率可达 32%。通过对罗勒对照株和诱变株形态学指标及细胞学特征统计分析证实, 获得的罗勒诱变株是多倍体。

## 项目基金

山西农业大学“中青年学术带头人”(XD201203), 山西省人才引进与开发专项基金。

## 参考文献 (References)

[1] 江苏新医学院 (1977) 中药大辞典(上册). 人民出版社, 上海, 1354.

- [2] 吕世民, 梁可钧, 葛传吉, 等 (1988) 怀牛膝多倍体育种的研究. *中药通报*, **7**, 395.
- [3] 程心昊, 高山林, 卞云云 (2003) 白术同源四倍体的诱导和鉴定及其与二倍体过氧化物酶的比较. *植物资源与环境学报*, **1**, 16.
- [4] Soltis, D.E. and Soltis, P.S. (1999) Polyploidy: Recurrent formation and genome evolution. *Trends in Ecology & Evolution*, **9**, 348.
- [5] Olimpienko, G.S. and Pavlova, N.A. (1995) Characteristics of the distant of gamma—Irradiation of seeds for diploid and polyploidy plants. *Radiacionnaya Biologiya Radioekologiya*, **35**, 518.
- [6] 中国科学院中国植物志编辑委员会 (1988) 中国植物志·第六十五卷(第二分册). 中国科学出版社, 北京, 561.
- [7] 郭平毅, 主编 (2006) 生物统计学. 中国林业出版社, 北京, 81-111.
- [8] 董娟, 杨娜, 吴玉香, 赵晓明 (2012) 大叶铁线莲四倍体的诱导及初步鉴定. *核农学报*, **3**, 0461-0465.
- [9] 李明银, 何云晓 (2005) 植物遗传嵌合体及其在观赏植物育种中的应用. *植物学通报*, **6**, 641-647.