



## 研究论文

### Research Article

# 砷对腺毛超微结构, 罗勒精油产量和质量的影响

Biswas S.<sup>1</sup>, Koul M.<sup>2</sup>, Bhatnagar A.K.<sup>1</sup>

1 Department of Botany, University of Delhi, Delhi – 110 007, India

2. Department of Botany, Hans Raj College, University of Delhi, Delhi – 110 007, India

✉ 通讯作者: [drmkoul@gmail.com](mailto:drmkoul@gmail.com); ☒ 作者

植物药与药理学杂志, 2013 年, 第 2 卷, 第 7 篇 doi: [10.5376/jpmpp.cn.2013.02.0007](https://doi.org/10.5376/jpmpp.cn.2013.02.0007)

收稿日期: 2013 年 06 月 07 日

接受日期: 2013 年 07 月 15 日

发表日期: 2013 年 08 月 07 日

本文首次发表在《Medicinal Plant Research》(2013, Vol. 5, No. 6)上。现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License 对其进行授权, 再次发表与传播。只要对原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。建议最佳引用格式:

引用格式(中文):

Biswas 等, 2013, 砷对腺毛超微结构, 罗勒精油产量和质量的影响, 植物药与药理学杂志 (online) Vol.2 No.7 pp.1-9 (doi: [10.5376/jpmpp.cn.2013.02.0007](https://doi.org/10.5376/jpmpp.cn.2013.02.0007))

引用格式(英文):

Biswas et al., 2012, Effect of arsenic on trichome ultrastructure, essential oil yield and quality of *Ocimum basilicum* L., *Zhiwuyao Yu Yaolixue Zazhi* (online) Vol.2 No.7 pp.1-9 (doi: [10.5376/jpmpp.cn.2013.02.0007](https://doi.org/10.5376/jpmpp.cn.2013.02.0007))

**摘要** 实验研究了各种砷处理对罗勒(一种重要的精油植物)的生长, 精油(EO)产量, 油的形态和腺毛超微结构组成的影响。将砷酸氢二钠[Na<sub>2</sub>HAsO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O]加入土壤中, 平均每千克土壤中含砷量分别为 0, 10, 50, 150 毫克。在 50-150 mg/kg 砷处理下, 砷应力引起茎轴系统的生长量和生物量的减少。精油产量在 10 和 50 mg/kg 砷处理下增加 3.5-4 倍, 但在 150 mg/kg 砷下显著下降了 0.08%。气相色谱分析表明, 存在于叶片中的主要精油复合物芳樟醇含量与对照相比在 10-150 mg/kg 砷处理下增强了 3-4 倍。其它复合物如 1,8-桉油醇, 甲基丁香酚随着砷处理量的增加而减少, 在 50 和 150 mg/kg 砷处理下用色谱仪未检测到肉桂酸甲酯。樟脑没有出现在任何处理过的植物中。光镜和电镜观察显示, 砷应力影响腺毛的形态及超微结构。我们观察到在 150 mg/kg 砷处理下叶毛出现早衰现象, 在分泌细胞细胞器中有明显的变化。在目前的研究中, 我们观察到精油产量和腺毛密度呈正相关关系。

**关键词** 砷, 精油, 罗勒, 香毛簇

## Effect of arsenic on trichome ultrastructure, essential oil yield and quality of *Ocimum basilicum* L.

Biswas S.<sup>1</sup>, Koul M.<sup>2</sup>, Bhatnagar A.K.<sup>1</sup>

1 Department of Botany, University of Delhi, Delhi – 110 007, India

2. Department of Botany, Hans Raj College, University of Delhi, Delhi – 110 007, India

✉ Corresponding author, [drmkoul@gmail.com](mailto:drmkoul@gmail.com); ☒ Authors

**Abstract** An experiment was carried out to study the effect of various arsenic (As) treatments on growth, essential oil (EO) yield, composition of oil and morphology and ultrastructure of glandular trichomes of *Ocimum basilicum* (sweet basil) an important EO yielding plant. As in the form of disodium hydrogen arsenate [Na<sub>2</sub>HAsO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O] was added in the soil in the range of 0, 10, 50, 150 mg/kg As. As stress caused reduction in growth and biomass of shoot system at 50 and 150 mg/kg As. EO yield increased by 3.5-4 times at 10 and 50 mg/kg As, but decreased significantly by 0.08% at 150 mg/kg As. GC analysis revealed that linalool the main EO compound present in the leaves augmented 3 to 4 times under 10-150 mg/kg As as compared to control. Other compounds such as 1,8-cineol and methyl eugenol decreased with increased As treatments whereas methyl cinnamate was not detected at 50 and 150 mg/kg As in chromatographs. Camphor did not appear in any of the As treated plants. Light microscopic studies and electron micrographs revealed that As stress affected glandular trichome morphology and ultrastructure. Premature senescence was observed in trichomes of leaves at 150 mg/kg As and noticeable changes were observed in cell organelles of secretory cells. A positive correlation between EO yield and trichome density was observed in the present study.

**Keywords** Arsenic; Essential oils; *Ocimum basilicum*; trichomes

含砷和含砷盐土壤的污染是一个全球性的环境问题。以砷为基础的农药、化肥、金属加工工业和燃煤单位是砷污染的一些主要来源(Meharg and Whitaker, 2002; Liao et al., 2004)。地下水的砷污染在南亚一些国家以前所未有的速度增长, 尤其是孟加拉和印度(Ghosh et al., 2006)。用砷污染过的水灌溉农田已经明显增大了土壤中的含砷量(Marin et al., 1992)。在被污染的土壤中生长的食物的消费将导致许多健康问题, 如癌症、心脑血管疾病和神经系统疾病(Gadepalle et al., 2008)。污染的水将有可能导致严重的皮肤过敏, 皮肤病变和其他健康相关的问题。



砷在环境中长时间的停留将导致许多重要的农作物产量和质量的下降(Rashid et al., 2004)。植物的根从土壤中摄取砷, 然后通过食物链转移到更高的营养水平(Zhang et al., 2002)。我们对多种作物进行了实验, 发现污染土壤对植物的生物生产力和产量具有不利影响(Carbonell-Barrachina et al., 1997)。我们详细研究了各种植物摄取砷后对其自身营养的影响, 如芥菜、稻、蜈蚣草和互花米草(Carbonell et al., 1998; Abedin and Meharg, 2002; Chaturvedi, 2006; Fayiga et al., 2007)。

高产精油的植物是重要的经济作物和具有药用价值的生物活性成分来源。这些植物被认为具有很强的耐受力, 能在冶炼厂周围被金属污染的土壤和重金属污染土壤中安全成长(Zheljakov and Nielsen, 1996; Salamon, 2008)。我们对一些重要的药用植物, 如狼把草、益母草、欧夏至草、香蜂草、牛至的研究显示, 在形态, 精油含量和植物产量上都没有严重的药害症状 (Zheljakov et al., 2008)。同样, 薄荷和罗勒的精油产量也不受土壤中镉、铅、铜处理的影响。然而, 这些重金属的应用可以改变精油组成(Zheljakov et al., 2006)。

罗勒(唇形科), 俗称甜罗勒, 是一种一年生芳香药用植物原产于印度和亚洲其他地区。在印度, 罗勒主要栽培在阿萨姆, 比哈尔, 北方邦和西孟加拉邦这些土壤被砷污染严重的地方(Heikens, 2006; Rao et al., 2007)。它在许多不同类型的土壤和气候条件下都能生长旺盛(Begum et al., 2002)。精油产自罗勒, 它被广泛应用于高档香水、香薰、调味酒和中药香料(Bahl et al., 2000; Kumar et al., 2004)。精油含有生物活性成分, 具有抗菌(Elgayyar et al., 2001), 抑菌(Reuveni et al., 1984), 杀虫(Bowers and Nishida, 1980)和化感特性(Rice, 1979)。传统上, 罗勒已被用于治疗头痛、咳嗽、腹泻、便秘、疣和肾功能障碍(Politeo et al., 2007)。精油的产量和成分依赖于许多环境因素, 农药的试验和栽培品种的类型(Jirovetz et al., 2003)。

罗勒的叶片正面和背面存在着非腺和具腺毛状体。非腺毛单列, 尖, 直或钩状, 其功能是为植物提供防御能力。腺毛负责合成、分泌和积累的精油(Fischer et al., 2011)。根据沃尔夫等人(2012)的研究, 土壤中含有浓度较高的重金属会影响毛状体的结构完整性。然而, 没有详细的实验证据提出腺毛是怎样适应含高水平砷的土壤, 以及腺毛结构变动是怎样影响精油产量和品质的。腺毛的超微结构是怎样受处理过的植物的影响和细胞器如内质网(ER), 线粒体, 质体的功能在应对高浓度砷时的重要性还未联系砷的毒性进行研究。

本研究的目的是调查: (一)不同浓度砷含量的土壤对精油产量和罗勒植物的组成的影响; (二)土壤中的砷对可分泌精油的腺毛的形态和超微结构的影响。研究已经对精油的分泌和腺毛的功能在土壤未受污染(对照组)和土壤经砷污染两种情况下进行了了解

## 1 结果与分析

### 1.1 砷对生长的影响

舌罗勒植物暴露于砷浓度增加的环境时营养生长逐步减少, 即茎长和茎生物量干重、鲜重均减少。观察到的最高减少量在 150 毫克/千克砷。与对照组相比茎长明显减少了 34.65%, 而其他处理方法之间的差异并不明显。茎的累积鲜重和干重在 150 毫克/千克砷处理下分别被抑制了 31.78%和 27%。然而, 在 10 毫克/千克砷处理下, 茎长、鲜重和干重又有所增加。

### 1.2 砷对精油产量和成分的影响

我们对三个月大的罗勒植物叶通过水蒸气蒸馏进行了叶提取。对照组植物的精油产量为 0.20%(w/w)。在 10 和 50 毫克/千克砷处理下, 精油产量显著增加 3.5-4 倍, 分别达到了 0.77%和 0.8%, 而在 150 毫克/千克砷处理下的产量显著降低至 0.08%(图 1)。对照组植物精油成分预估为芳樟醇(0.0013 mg/g 干重), 肉桂酸甲酯(0.013 mg/g 干重)、樟脑(0.0072 mg/g 干重), 1,8-桉叶素(0.009 mg/g 干重)和甲基丁香酚(0.028 mg/g 干重)。与对照组相比芳樟醇含量在 10-150 毫克/千克砷处理下增加 3-4 倍。肉桂酸甲酯的浓度在 10 毫克/千克砷处理下显示下调到 72.30%, 而在 50 和 150 毫克/千克砷下, 它没有被检测到。甲基丁香酚和 1,8 -桉叶素与对照组植物叶片中提取的精油相比在 150 毫克/千克砷处理下分别减少了 67.7%和 96%。樟脑受到砷毒性的严重影响, 它在所有砷处理过的植物中都没有被检测到(表 2)。

### 1.3 砷对腺毛密度及生长的影响

#### 1.3.1 腺毛密度

正面的腺毛密度在 10 和 50 毫克/千克砷处理下与对照组植物相比增加 2-3 倍。在 150 毫克/千克砷处理下, 腺毛密度降低了 34%。10 毫克/千克砷处理下, 表皮腺毛密度增加到 66%, 而在 50 和 150 毫克/千克砷处理下与对照组相比降低了 67 和 34%分别较对照(图 2)。

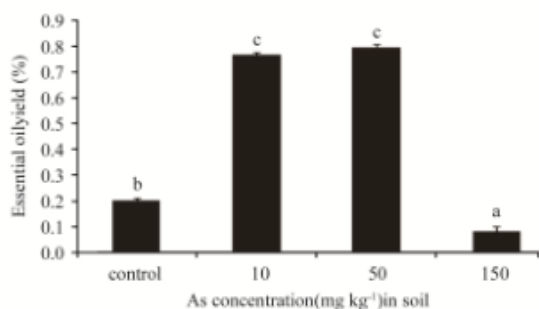


图 1EO 产量(%)层塔受不同浓度的砷含量的影响。用不同字母的值(A-C)在 P≤0.05 下明显不同

Figure 1. EO yield (%) of *O. basilicum* as affected by different concentrations of arsenic levels. Values with different superscripts (a-c) are significantly different at  $p \leq 0.05$

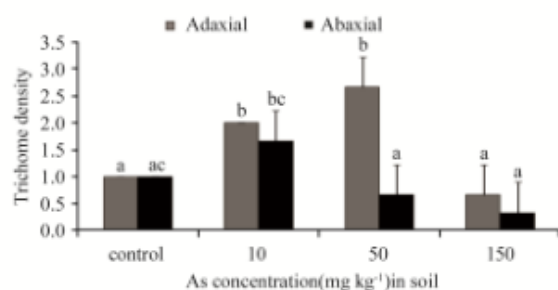


图 2 正面和背面的腺毛密度(2 cm)影响不同的砷含量。用不同字母的值(A-C)在 P≤0.05 下明显不同

Figure 2. Trichome density (cm<sup>-2</sup>) on both adaxial and abaxial surfaces of *O. basilicum* as affected by different arsenic levels. Values with different superscripts (a-c) are significantly different at  $p \leq 0.05$

表 1 砷对芽长的影响, 鲜重和干重

Table 1 Effect of arsenic on shoot length, fresh wt. and dry wt. of *Ocimum basilicum*

Arsenic (mg/kg soil)	Shoot length	Shoot FW	Shoot DW
0	47.33±1.16 c	36.50±2.50 c	3.10±0.17 b
10	68.96±0.87 d	60.33±2.08 d	5.16±0.37 c
50	40.90±1.65 b	32.73±1.55 b	3.23±0.61 b
150	30.93±1.44 a	24.90±0.65 a	2.26±0.0 a

Values with different letters (a-d) are significantly different at  $p \leq 0.05$  (means of three replicates ± S.D.).

表 2 砷对精油成分的影响

Table 2 Effect of arsenic on essential oil composition of *Ocimum basilicum*.

Compounds	0 mg/kg	10 mg/kg As	50 mg/kg As	150 mg/kg As
Methyl cinnamate	0.013±0.005	0.0036±0.00	nd	nd
Linalool	0.0013±0.00 a	0.005±0.00 c	0.0047±0.00 bc	0.004±0.00 b
Methyl eugenol	0.028±0.00 e	0.006±0.00 bd	0.008±0.00 cd	0.001±0.00 a
1,8-cineol	0.009±0.001 c	0.005±0.00 b	0.0036±0.00 a	0.0029±0.00 a
Camphor	0.0072±0.00	nd	nd	nd

nd: not detected Values with letters (a-e) are significantly difference at  $p \leq 0.05$  (means of three replicates ± S.D.).

### 1.3.2 毛状体结构和超微结构

我的研究表明, 腺毛在控制植物的叶片与茎球状, 1-3 单元和头四分泌细胞(图 3A)。在 10 和 50 毫克/千克下观察, 由分泌细胞和细胞壁折叠混乱的毛头土壤结构倒塌。用 150 mg/kg 治疗植物毛显示衰老样。头细胞呈蘑菇状外观, 部分突出的表皮凹陷(图 3D)。SEM 调查显示在控制植物叶片周围的腺毛头部有弱赤道线(图 4A)。角质层沿着这条线破裂, 皮下腔崩溃后导致分泌物的释放。观察到处理过的植物的毛状体成熟早。观察



毛 10 的分泌细胞和折叠的细胞壁解体, 用 50 和 150 mg/kg 治疗。暴露头细胞, 没有角质层, 注意到在 50 毫克/公斤的(图 4C)大量的深槽状体在 150 毫克/公斤下是常见的(图 4D), 是一个典型的行为成熟的毛状体(沃克, 1993)。蜡沉积在叶表面上更清晰可见(图 4D)。观察到表皮细胞的变形, 随着浓度的增加。非腺毛也失去了结构的完整性。

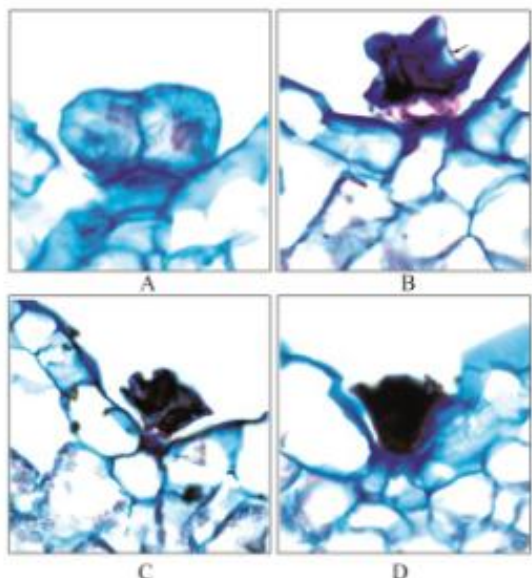


图 3 光镜显示下罗勒叶腺毛对砷浓度的响应(40x)

注:(a)控制: 发展毛。

(b)10 毫克/公斤为: 头部细胞的折叠(箭)。

(c)在 50 毫克/公斤为: 倒塌的头细胞和缩短的茎细胞。

(d)在 150 毫克/千克: 衰老的毛。

Figure 3. Light micrographs showing the response of *O.basilicum* leaf peltate glandular trichomes to arsenic at different concentrations (40X)

Note:(A)Control: Developing trichome.

(B)10 mg/kg As: Folding of head cells (arrow).

(C)At 50 mg/kg As: Collapsed head cells and shortening of stalk cell.

(D)At 150 mg/kg As: Senescent trichome.

### 1.3.3 毛状体结构和超微结构

透射电镜研究对腺毛分泌细胞提供了进一步的见解。发达的中心头内观察到细胞核和致密的细胞质控制植物细胞。大液泡和线粒体具有发达的嵴遍布(图 4E)。粗面内质网(RER)与高尔基体也清晰可见, 象征细胞积极参与 EO 分泌。在 10 毫克/公斤下, 没有显著的变化, 观察头细胞比较难以控制。在细胞中观察到发达的核与电子致密的染色质材料(图 4F)。然而, 在 50 毫克/公斤下, 被视为连接分泌细胞壁大更突出线粒体(图 4G)。在 150 毫克/公斤下, 在结构和超微结构水平腺毛呈不同的变化。细胞表现出较少的空泡。粗面内质网良好, 但线粒体的大小观察到减少(图 4H)。

## 2 讨论

本研究的结果清楚地表明, 由于高毒性, 香草生长显著下降, 但在低浓度的效果不显著。一个植物生长增加为 10 毫克/公斤, 与土壤中的观察结果是一致的。研究黄芩这类重要的草本植物, 其应用在传统中医药中含量较低(Cao et al., 2009)。这种积极的反应在较低的浓度可以与磷一起吸收。磷酸盐和砷酸盐是传递到植物根的常见载体。然而, 磷酸盐/血浆膜载体比砷酸盐具有更高的亲和力(Meharg and Macnair, 1990)。磷酸盐也被报道是一种有效的砷吸收抑制剂(Meharg and Macnair, 1990)。在土壤低浓度时, 通过增加土壤磷的有效性使植物增长四倍。

Mu 在植物组织中的 EO 产量增加时观察到土壤中的浓度提高到 50 毫克/公斤, 而 150 毫克/公斤的石油产量显著减少约 60%。重金属诱导增强环氧乙烷在生长培养基中的低浓度产量有已报道的其他物种如早期 EO 屈



服 *Matrica chamomilla*(纳昔里表 et al., 2010), *Mentha* 薄荷(Prasad et al., 2010)和鼠尾草(stancheva et al., 2009)。EO 含量增加重金属的应用是不正确的理解, 变化被归因于金属元素对酶活性和酶活性的影响

碳代谢, 进而影响 EO 合成途径(Prakash 和 kardage, 1980)。环氧乙烷生产使 EO 释放密度增加到中等水平的研究现状。这是对增加的石油部分的解释

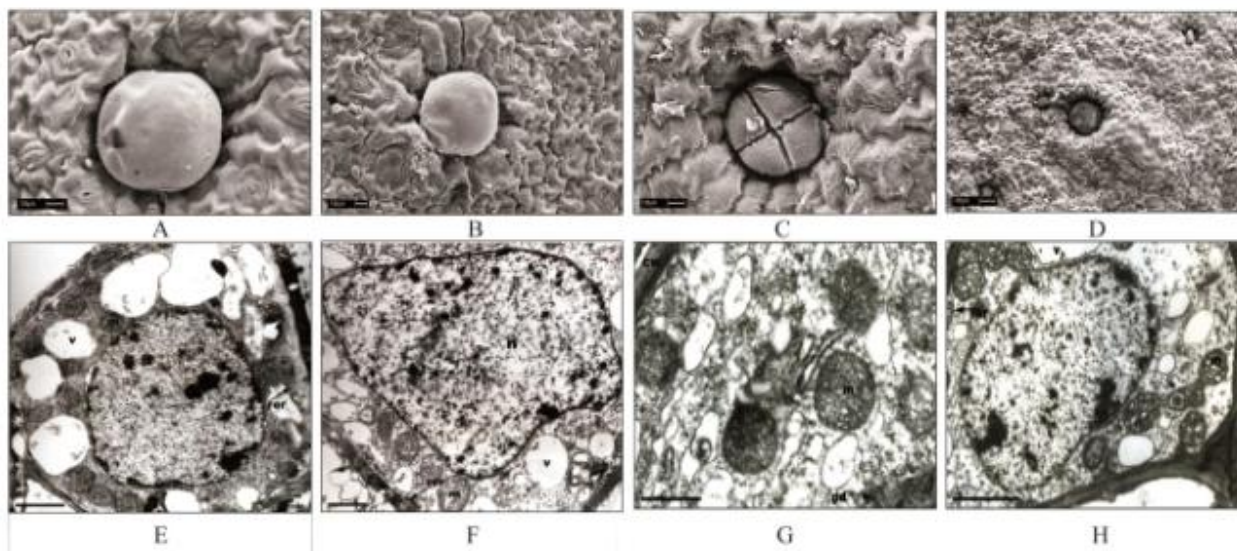


图 4 扫描显示不同浓度砷对腺毛形态影响的电镜照片

注:(a)控制: 成熟的盾状腺毛。箭头表现在中央部分对应表皮下面的子腔

(b)10 毫克/公斤的成熟的盾状腺毛由 AS: 正面的叶表面

(C)50 毫克/公斤, 与成熟的盾状腺毛: 破皮、细胞

(d)为 150 毫克/公斤: 拔毛透射电子盾状腺毛和腺细胞主动排泄分泌 c 砷。细胞壁(CW:现象:粗内质网, 线粒体, 核, N: M: 无气泡, V: 高尔基体: D: PD 控制(F)和 10 毫克/公斤排泄分泌型在细胞内

(g)如: 50 毫克/公斤的大形线粒体。在排泄分泌细胞胞间连丝墙(箭头)

(h)为 150 毫克/公斤: 排泄分泌细胞表现在外围和嵴形态

Figure 4 Scanning electron micrographs of *O. basilicum* showing effects of different concentrations of arsenic on morphology of peltate glandular trichomes

Note: (A) Control: Mature peltate trichome. Arrow indicates cuticle in central part showing a buldge, possibly corresponding to sub-cuticular cavity underneath.

(B) 10 mg/kg As: Mature peltate trichome on adaxial leaf surface.

(C) 50 mg/kg As: Mature peltate trichome with torn cuticle sheath, disclosing the head cells.

(D) 150 mg/kg As: Sunken trichome. Transmission electron micrographs of glandular cells of peltate trichome in the active secretory stage under different concentrations of arsenic. (cw: cell wall, rer: rough endoplasmic reticulum, m: mitochondria, n: nucleus, v: vacuole, d: dictyosome, pd: plasodesmata). (Bar = 1  $\mu$ m)

(E-F) Control and 10 mg/kg As: Details of cytoplasm and organelles in secretory cells.

(G) 50 mg/kg As: Large-shaped mitochondria. Plasmodemata in the secretory cell walls (arrow).

(H) 150 mg/kg As: Secretory cell showing peripheral nucleus and mitochondrial aberrations in the form of inflated cristae.

单位叶干重。根据 Charles 等人(1990), EO 含量的增加间接干扰营养素的净同化率, 植物或由不平等分配的生长和分化资源。EO 在罗勒叶产生的强烈抑制以 150 毫克/公斤为准。减少光合作用和/或代谢系统的额外变化可能引起这种抑制作用。根据 Croteau 和 Johnson (1984)环氧乙烷合成主要发生在表皮油腺, 是由于碳异养, 因此, 取决于相邻的光合作用细胞是否连续碳源供应。EO 生产也依赖于各种不同的可用性土壤中的营养离子。营养物质平衡的破坏减少了石油生产中观察到的罗勒暴露于土壤中的植物更高水平。这样的在植物生长中也观察到了结果盐渍土。在环 9 氧乙烷产量由于高剂量减少 100 毫米时, NaCl 已观察到丹参厚朴(Ben Taarit et al., 2009)和牛至马约拉纳(Baatour et al., 2010)。如在土壤中干扰离子平衡与植物营养离子的有效性来响应盐度所观察到的系统。植物生物量和含油量的比较研究不同的治疗方法显示, 随着压力的显示对生物量的影响比石油含量更严重。这种低的石油含量减少肯定是一个 EO 植物优势。Biswas 等人(2011)在一个详细的审查中, 已



归因于石油产量的变化不同 EO 植物连锁效应的应力加强在盐、重金属或水上可利用性, 植物所遇到的压力影响营养元素的存在和可用性, 和分泌途径。

腺毛分泌的超微结构研究, 植物生长在早期成熟度土壤。在 150 毫克/公斤下, 头部细胞的结构由球状转变为蘑菇状和毛被嵌入到表皮表面。这种变化一般观察到在分泌期毛(Gravano et al., 1998)。Werker et al. (1993) 也观察到, 在香草的腺毛中嵌入表皮毛状体达到成熟时进行衰老。皮毛过早衰老在目前的研究中明显观察到的反应为毒性。

在 10 毫克/千克腺毛超微结构下, 没有显示毛的对照比较的任何变化, 植物在两种治疗方法中, 头部细胞显示高度有组织的细胞质, 大的核, 和许多线粒体。这些功能是典型的分泌具有高代谢活性的组织。分泌是将能量用于代谢的活性过程分区、离子挤压, 或生物合成产品((Fahn, 1988)。因此, 存在一个大的腺毛线粒体数量主动分泌的指标。大液泡存在是有关的代谢产物和离子的储存分泌装置(Figueiredo, 1994)。在 50 毫克/公斤下, 具有广泛的粗面内质网和线粒体, 这表明活性较高的腺体细胞, 刺激环氧乙烷的生产。存在较多突出的胞间连丝连接细胞质分泌的细胞间有增强的毛物运输。虚高的线粒体的畸变嵴和更少的电子致密物质出现在 150 毫克/公斤时。欠发达的细胞器毛状体可能是 EO 产量低的原因。这清楚地表明了更高剂量的影响细胞和破坏他们的代谢机械中观察到的变化产量是表现形式细胞和亚细胞水平。

罗勒香气特征出现 1,8-桉油醇, 肉桂酸甲酯、芳樟醇(Lee et al., 2005), 樟脑, 1,8-桉树脑和芳樟醇也被称为是生物活性成分(Morris et al., 1979)。这些化合物具有抗菌和具有很高治疗价值的抗氧化性能(Raseetha et al., 2009)。气相色谱分析显示芳樟醇、*O. basilicum* 的主要成分不受接触的影响, 但相对浓度甲基丁香酚, 肉桂酸甲酯, 1,8-桉树脑和当植物受到作为植物时, 减少了应力(表 2)。这样一个成分 EO 的变化不利于石油质量。

对无樟脑含量的 1,8-桉树脑更高层次的描绘, 有一个记录了这两个成分的防御潜力参与感反应(Rice, 1979)。负责罗勒典型香气化合物的研究, 由于毒性, 这也降低了罗勒的抗氧化性。这样的变化在重金属胁迫下响应 EO 组成(Nasiri et al., 2010)、*Mentha arvensis* (Prasad et al., 2010)和鼠尾草(stancheva et al., 2009)。对一些重要的妥协化合物反映酶的失活或重定向的代谢功能, 以保持增长(Murch et al., 2003)。

### 3 材料与方 法

#### 3.1 植物材料, 生长条件和处理

采购是罗勒种子国家局种质资源保护处植物遗传资源(NBPGR), 新德里(印度)。盆栽试验研究德令哈市(印度)德里大学植物园。种子在十月播种在花盆(38 厘米直径)充满 4 公斤风干土和堆肥的平等比。土壤为粘壤土, pH 值为 7.2, NO 125 N 3 毫克/公斤, 速效磷 0.5 毫克/公斤和 K 120 毫克/公斤。空气干燥的土壤进行了修改, 磷酸氢二钠[2 HASO 4 7H 2 O]在浓度为 10, 50 和 150 作为毫克/公斤土壤, 每个有三个副本。不带盆作为控制。每种二十种种子盆栽和五个均匀生长的幼苗每罐为进一步研究保留。调节植物生长在自然条件下的光、温、湿度, 植物在四个月后到达收获期。全株挖出。重新拍摄系统。烘干植物组织后, 记录在 72 摄氏度的干燥重量。

#### 3.2 EO 的提取

舌五十克的干芽(叶和茎)分别为进行蒸汽蒸馏萃取 4 小时根据饶等人给出的协议(2005)

稍作修改。进行蒸馏收集, 并分为子样本。每个子样本混合 100 毫升正己烷溶解 EO。EO 获得样品后, 无水钠干燥使它不含水分。环氧乙烷通过校准滴定管测量, 环氧乙烷产量的百分比用公式计算组织样本, 饶等(2005): 环氧乙烷收率(%)=量(g)/环氧乙烷回收量作物生物量蒸馏(G)x100

#### 3.3 EO 的分析

通过气相色谱进行 EO 分析使用岛津气相色谱 2014 配备火焰离子化检测器(FID)和电子压力控制(EPC)喷油器。氦作为载体气体流量 1.2 毫升/分钟通过 Restek DB-5 毛细管柱(长 30 米×0.53 毫米直径和  $\mu$  膜厚 0.5 $\mu$ m)。1 $\mu$ L 油样品注射后, 用正己烷稀释(0.05 毫升油分为 0.95 毫升用气相色谱标准级正己烷)和样品用气相色谱法分析。分析程序为 15 分钟在 60 $^{\circ}$ C, 上升到 240 $^{\circ}$ C在 5 $^{\circ}$ C/min 的速度, 通过比较确定的光电元件保留时间与真实的标准 1,8-桉叶素、芳樟醇、甲基 cinnamte, 甲基丁香酚樟脑(CDH 和默克, 印度)下运行相同条件下(温度, 1965)。浓度在油样中的每个组分计算使用以下方程(Lee et al., 2005)。

浓度(毫克/克)=提取物重量(不含溶剂)×气相色谱峰面积% 100(毫克)/重量的植物材料(克)



### 3.4 毛状体的研究

舌用扫描电子显微镜(扫描电镜)和透射电子显微镜(透射电镜)微形态进行观察光镜下的新鲜罗勒叶(LM)。用透射电镜显示毛状体的超微结构的细节。

3.4.1 光学显微镜(LM): 准备研究单位叶腺毛密度在正面和背面的表面面积。石蜡石蜡切片, 植物材料固定在 FAA(甲醛: 冰醋酸: 乙醇, 1:1:18, 24 h, 通过丁醇(TBA)系列固定植物部分的脱水。在石蜡包埋后进行奥勃良的程序(1981)。嵌入材料的块被修剪安装在木块切片 Riechert 旋转切片机的帮助。8 $\mu$ m 厚度切割、脱蜡、脱水乙醇二甲苯系列和 1% 番红染色 1% 雅特蓝组合。安装完成在 DPX, 尼康显微镜下观察。

3.4.2 扫描电子显微镜(扫描电镜): 叶段被固定在 Karnovsky、0.1 M 磷酸钠缓冲液在 pH 7.4 6-8 在 4 摄氏度时, 在缓冲区中的材料是在分级乙醇系列中脱水, 临界点 CO<sub>2</sub>(Serrato Valenti et al., 1997)。在 435 电子显微镜扫描下观察 15 千伏。

3.4.3 透射电子显微镜(透射电镜): 超微结构调查, 叶被修剪从边缘到中脉小块固定在反应液、缓冲 0.1 米钠在 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液为 6-8 h 40°C 和后 1% 四氧化钨固定。经过脱水乙醇系列, 材料是嵌入在 EPON 环氧树脂。切片常规沾满铀和柠檬酸铅(Ascens ão et al., 1997), 需要检查下飞利浦 200 传输 80 千伏的电子显微镜。

### 3.5 统计分析

数据进行统计分析软件包 SPSS 10 统计软件包(社会科学)。单向方差分析(方差分析)其次是多重比较显著性差异(LSD)进行检查之间的差异的意义在  $P \leq 0.05$  处理。

## 4 结论

在生长培养基中, 降低生长的部分生物量和香草。EO 产量显示在 10 和 50 毫克/公斤条件下, 它减少到 150 毫克/公斤。在治疗上的芳樟醇主要成分增强。肉桂酸甲酯和樟树减少高浓度。观察正相关腺毛密度和 EO 产量之间的发现, 结构和超微结构的改变证明腺毛在应力作用下, 实现性早熟, 这进一步导致故障的分泌机械。然而, 还有进一步需要进行在自然条件和控制条件下的实验了解确切的机制代谢途径改变。数据表明了一个早期迹象, 环境污染影响药材质量。这个优化农业实践的发展保证持续培养和生产必要的 EO 产量。

## 参考文献

- Abedin M.J., and Meharg A.A., 2002, Relative toxicity of arsenite and arsenate on germination and early seedling growth of rice (*Oryza sativa* L.), *Plant Soil*, 243: 57-66  
<http://dx.doi.org/10.1023/A:1019918100451>
- Ascens ão L., Marques N., and Pais M.S., 1997, Peltate glandular trichomes of *Leonotis leonurus* leaves: ultrastructure and histochemical characterization of secretions, *Int. J. Plant Sci.*, 158: 249-258  
<http://dx.doi.org/10.1086/297436>
- Baatour O., Kaddour R., Aidi Wannes W., Lachaa M., and Marzouk B., 2010, Salt effects on the growth, mineral nutrition, essential oil yield and composition of marjoram (*Origanum majorana*), *Acta Physiol. Plant.*, 32: 45-51  
<http://dx.doi.org/10.1007/s11738-009-0374-4>
- Bahl J.R., Garg S.N., Bansal R.P., Naqvi A.A., Singh V., and Kumar S., 2000, Yield and quality of shoot essential oil from the vegetative, flowering and fruiting stage crops of *Ocimum basilicum* cv Kusumohak, *J. Med. Arom. Plant Sci.*, 22: 743-746
- Begum F., Amin N., and Azad M.A.K., 2002, In vitro rapid clonal propagation of *Ocimum basilicum* L., *Plant Tissue Cult.*, 12: 27-35
- Ben Taarit M., Msaada K., Hosni K., Hammami M., Kchouk M.E., and Marzouk, B., 2009, Plant growth, essential oil yield and composition of sage (*Salvia officinalis* L.) fruits cultivated under salt stress conditions, *Ind. Crops Prod.*, 30: 333-337  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.06.001>
- Biswas S., Koul M., and Bhatnagar A. K., 2011, Effect of salt, drought and metal stress on essential oil yield and quality in plants, *Nat. Prod. Commun.*, 10: 1559-1564
- Bowers W.S., and Nishida R., 1980, Juvocimenes: potent juvenile hormones mimics from sweet basil, *Science*, 209: 1030-1032  
<http://dx.doi.org/10.1126/science.209.4460.1030>
- Cao H., Jiang Y., Chen J., Zhang H., and Huang W., 2009, Arsenic accumulation in *Scutellaria baicalensis* Georgi and its effects on plant growth and pharmaceutical components, *J. Hazard. Mater.*, 171: 508-5013  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.06.022>
- Carbonell-Barrachina A.A., Aarabi M.A., DeLaune R.D., Gambrell R.P., and Patrick Jr, W.H., 1998, Arsenic in wetland vegetation: availability, phytotoxicity, uptake and effects on plant growth and nutrition, *Sci. Total Environ.*, 217: 189-199  
[http://dx.doi.org/10.1016/S0048-9697\(98\)00195-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0048-9697(98)00195-8)
- Carbonell-Barrachina A.A., Burlo F., Burgos-Hernandez A., Lopez E., and Mataix J., 1997, The influence of arsenite concentration on arsenic accumulation in tomato and bean plants, *Sci. Hortic.*, 71: 167-176  
[http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4238\(97\)00114-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4238(97)00114-3)
- Charles D.J., Joly R.J., and Simon J.E., 1990, Effect of osmotic stress on the essential oil content and composition of peppermint, *Phytochemistry*, 29: 2837-2840  
[http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422\(90\)87087-B](http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422(90)87087-B)



- Chaturvedi I., 2006, Effects of arsenic concentrations on growth and arsenic uptake and accumulation by rice (*Oryza sativa*) genotypes, *Electron. J. Environ. Agric. Food Chem.*, 5: 1546-1552
- Croteau R., and Johnson M., 1984, Biosynthesis of terpenoids in glandular trichomes, In: Rodriguez E., Healy P.L., and Mehta I. (eds.), *Biology and chemistry of plant trichomes*, Plenum, New York, pp.133-185  
[http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4899-5355-1\\_7](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4899-5355-1_7)
- Deef H.E.S., 2007, Copper treatments and their effects on growth, carbohydrates, minerals and essential oils contents of *Rosmarinus officinalis* L., *World J. Agric. Sci.*, 3: 322-328
- Elgayyar M., Draughon F.A., Golden D.A., and Mount J.R., 2001, Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms, *J. Food Prot.*, 64: 1019-1024
- Fahn A., 1988, Secretory tissues in vascular plants, *New Phytol.*, 108:229-257  
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.1988.tb04159.x>
- Fayiga A.O., Ma L.Q., and Zhou Q., 2007, Effects of plant arsenic uptake and heavy metals on arsenic distribution in an arsenic-contaminated soil, *Environ. Pollut.*, 147: 737-742  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2006.09.010>
- Figueiredo A.C., and Pais M.S., 1994, Ultrastructural aspects of the glandular cells from the secretory trichomes and from the cell suspension cultures of *Achillea millefolium* L. ssp. *millefolium*, *Ann. Bot.* 74: 179-190  
<http://dx.doi.org/10.1006/anbo.1994.1107>
- Fischer R., Nitzan N., Chaimovitch D., Rubin B., and Dudai N. 2011, Variation in essential oil composition within individual leaves of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) is more affected by leaf position than by leaf age, *J. Agric. Food Chem.*, 59: 4913-4922  
<http://dx.doi.org/10.1021/jf200017h>
- Gadepalle V.P., Ouki S.K., Herwijnen R.V., and Hutchings T., 2008, Effects of amended compost on mobility and uptake of arsenic by rye grass in contaminated soil, *Chemosphere*, 72: 1056-1061  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.03.048>
- Ghosh A.K., Sarkar D., Bhattacharyya P., Maurya U.K., and Nayak D.C., 2006, Mineralogical study of some arsenic contaminated soils of West, India, *Geoderma*, 136: 300-309  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.geoderma.2006.03.044>
- Gravano E., Tani C., Bennici A., and Gucci R., 1998, The ultrastructure of glandular trichomes of *Phillyrea latifolia* L. (Oleaceae) leaves, *Ann. Bot.*, 81: 327-335  
<http://dx.doi.org/10.1006/anbo.1997.0562>
- Heikens A., 2006, Arsenic contamination of irrigation water, soil and crops in Bangladesh: risk implication for sustainable agriculture and food safety in Asia, Food and Agriculture Organization of United Nations Regional Office for Asia and the Pacific, Bangkok, Thailand, pp.1-38
- Jirovetz L., Buchbauer G., Shafi M.P., and Kaniapady M.M., 2003, Chemotaxonomical analysis of the essential oil aroma compounds of four different *Ocimum* species from southern India, *Eur. Food Res. Technol.*, 217: 120-124  
<http://dx.doi.org/10.1007/s00217-003-0708-1>
- Kovats E., 1965, Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system, *Adv. Chromatogr.*, 1: 229-247
- Kumar B., Yaseen M., Patra N.K., Srivastava H.K., Naqvi A.A., and Ram P., 2004, Chemotypic variation in morphologically homogenous gene pool of Indian basil, *Indian Perfum.*, 48: 289-297
- Lee S.J., Umamo K., Shibamoto T., and Lee K.G., 2005, Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties, *Food Chem.*, 9: 131-137  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.05.056>
- Liao X.Y., Chen T.B., Lei M., Huang Z.C., Xiao X.Y., and An Z.Z., 2004, Root distributions and elemental accumulations of Chinese brake (*Pteris vittata* L.) from As-contaminated soils, *Plant Soil*, 261: 109-116  
<http://dx.doi.org/10.1023/B:PLSO.0000035578.24164.fa>
- Marin A.R., Masscheleyn P.H., and Patrick W.H.Jr., 1992, The influence of chemical form and concentration of arsenic on rice growth and tissue arsenic concentration, *Plant Soil*, 139: 175-183  
<http://dx.doi.org/10.1007/BF00009308>
- Meharg A.A., and Hartley-Whitaker J., 2002, Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species, *New Phytol.*, 154: 29-43  
<http://dx.doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00363.x>
- Mehrag A.A., and Macnair M.R., 1990, An altered phosphate uptake system in arsenate-tolerant *Holcus lantus* L., *New Phytol.*, 116: 29-35  
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.1990.tb00507.x>
- Morris J.A., Khettry A., and Seitz E.W., 1979, Antimicrobial activity of aroma chemicals and essential oils, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 56: 595-603  
<http://dx.doi.org/10.1007/BF02660245>
- Murch S.J., Haq K., Ruoainghe H.P.V., and Saxena P.K., 2003, Nickel contamination affects growth and secondary metabolite composition of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.), *Environ. Exp. Bot.*, 49: 251-257  
[http://dx.doi.org/10.1016/S0098-8472\(02\)00090-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0098-8472(02)00090-4)
- Nasiri Y., Zehtab-Salmasi S., Nasrullahzadeh S., Najafi N., and Ghassemi-Golezani K., 2010, Effects of foliar application of micronutrients (Fe and Zn) on flower yield and essential oil of chamomile (*Matricaria chamomilla* L.), *J. Med. Plants Res.*, 4: 1733-1737
- O'Brien T.P., and McCully M.E., 1981, *The study of plant structure: principles and selected methods*, Termcarphi Pty. Ltd., Melbourne, Australia, pp.357
- Politeo O., Jukica M., and Milosa M., 2007, Chemical composition and antioxidant capacity of free volatile aglycones from basil (*Ocimum basilicum* L.) compared with its essential oil, *Food Chem.*, 101:379-385  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.01.045>
- Prakash D.C., and Kardage B.A., 1980, Influence of sodium chloride and sodium sulfate salinities on photo synthetic carbon assimilation in peanut, *Plant Soil*, 56: 201-207  
<http://dx.doi.org/10.1007/BF02205848>
- Prasad A., Singh A.K., Chand S., Chanotiya C.S., and Patra D.D., 2010, Effect of chromium and lead on yield, chemical composition of essential oil, and accumulation of heavy metals of mint species, *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, 41: 2170-2186  
<http://dx.doi.org/10.1080/00103624.2010.504798>
- Rao B.R.R., Kaul P.N., Syamasundar K.V., and Ramesh S., 2005, Chemical profiles of primary and secondary essential oils of palmarosa (*Cymbopogon martini* (Roxb.) Wats var. *motia* Burk.), *Ind. Crops Prod.* 21: 121-127





- <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2004.02.002>
- Rao E.V.S.P., Puttanna K., Rao R.S.G., and Ramesh S., 2007, Nitrogen and potassium nutrition of French basil (*Ocimum basilicum* Linn.), *J. Spices Aromatic Crop.*, 16: 99-105
- Raseetha V.S., Cheng S.F., and Chuah C.H., 2009, Comparative study of volatile compounds from genus *Ocimum*, *Am. J. Appl. Sci.*, 6: 523-528  
<http://dx.doi.org/10.3844/ajassp.2009.523.528>
- Rashid H.A., Nath D.K., Hossain M., Khan M.U., Shah A.L., Saleque M.A., Rahman M.S., and Ghani M.A., 2004, Variation of arsenic content in groundwater with depth and river distance: GIS mapping. In: Shah Latif et al. (eds.), *Arsenic in the food chain: assessment of arsenic in the water-soil-crop systems*, BRRI, Gazipur, Bangladesh, pp.53-71
- Reuveni R., Fleischer A., and Putievsky E., 1984, Fungistatic activity of essential oils from *Ocimum basilicum* chemotypes, *J. Phytopathol.*, 110: 20-22  
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0434.1984.tb00736.x>
- Rice E.L., 1979, Allelopathy---an update, *Bot. Rev.*, 45: 15-109  
<http://dx.doi.org/10.1007/BF02869951>
- Salamon I., 2008, Chamomile biodiversity of the essential oil qualitative--quantitative characteristics, In: Sener, B. (ed.), *Innovations in chemical biology*, Springer Publishers, the Netherlands, pp.83-90
- Serrato-Valenti G., Bisio A., Cornara L., and Ciarallo G., 1997, Structural and histochemical investigation of the glandular trichomes of *Salvia aurea* L. leaves, and chemical analysis of the essential oil, *Ann. Bot.*, 79: 329-336  
<http://dx.doi.org/10.1006/anbo.1996.0348>
- Stancheva I., Geneva M., Hristozkova M., Boychinova M., and Markovska Y., 2009, Essential oil variation of *Salvia officinalis* (L.) grown on heavy metals polluted soil, *Biotechnol. Biotechnol. Equip.*, 23: 373-376  
<http://dx.doi.org/10.1080/13102818.2009.10818442>
- Werker E., 1993, Function of essential oil-secreting glandular hairs in aromatic plants of the Lamiaceae---a review, *Flavour Fragrance J.*, 8: 249-255  
<http://dx.doi.org/10.1002/ffj.2730080503>
- Wolff G., Pereira G.C., Castro E.M., Louzada J., and Coelho F.F., 2012, The use of *Salvinia auriculata* as a bioindicator in aquatic ecosystem: biomass and structure dependent on the cadmium concentration, *Braz. J. Biol.*, 72: 71-77  
<http://dx.doi.org/10.1590/s1519-69842012000100009>
- Zhang W., Cai Y., Tu C., and Ma L.Q., 2002, Arsenic speciation and distribution in an arsenic hyperaccumulating plant, *Sci. Total Environ.*, 300: 167-177  
[http://dx.doi.org/10.1016/S0048-9697\(02\)00165-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0048-9697(02)00165-1)
- Zheljazkov V.D., Craker L.E., and Xing B., 2006, Effects of Cd, Pb, and Cu on growth and essential oil contents in dill, peppermint, and basil, *Environ. Exp. Bot.*, 58: 9-16  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.06.008>
- Zheljazkov V.D., Jeliakova E.A., Kovacheva N., and Dzhurmanski A., 2008, Metal uptake by medicinal plant species grown in soils contaminated by a smelter, *Environ. Exp. Bot.*, 64: 207-216  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2008.07.003>
- Zheljazkov V. D., and Nielsen N.E., 1996, Studies on the effect of heavy metals (Cd, Pb, Cu, Mn, Zn and Fe) upon the growth, productivity and quality of lavender (*Lavandula angustifolia* Mill) production, *J. Essent. Oil Res.*, 8: 259-274  
<http://dx.doi.org/10.1080/10412905.1996.9700612>