

# 常夏石竹快速繁殖技术研究

宛淑艳

(湛江师范学院 生命科学与技术学院, 广东 湛江 524048)

**摘要:**以常夏石竹茎段为培养材料,探讨了适于常夏石竹快速繁殖的培养条件。结果表明:腋芽增殖培养基为 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA;诱导愈伤组织的培养基为 MS+1.0 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L 6-BA;愈伤分化培养基为 MS+0.2 mg/L 6-BA+4 mg/L KT+0.02 mg/L IAA。

**关键词:**常夏石竹;茎段;快速繁殖

**中图分类号:**S 681.503.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2009)05-0171-04

常夏石竹 (*Dianthus plummaris* L.), 又名地石竹, 石竹科、石竹属多年生宿根草本植物。常夏石竹通常作 2 a 生栽培, 株高 10 ~ 15 cm, 四季常绿, 三季开花, 适应性<sup>[1]</sup>。常夏石竹茎直立、绿色、细弱, 自基部抽枝呈丛生型。单叶对生, 线状披针形, 先端渐尖, 基部互抱茎节部, 叶缘有毛, 灰绿色, 茎节膨大。花生于分支的顶端, 单生或数朵簇生, 石竹型花冠, 花冠 5 枚, 边缘有不规则的浅齿裂, 有红、粉红、白色、紫红和杂色, 有香气, 硕果矩圆形。种子扁, 黑褐色。花期 4 ~ 10 月, 集中于 4 ~ 5 月, 果熟期 6 月<sup>[2,3]</sup>。常夏石竹定植成活后通常靠自然降水就能满足自身生长需要, 与其他草坪相比节水 70% 以上, 特别适合干旱少雨地区。其抗寒性极强, 能耐 -38℃ 低温, 对土壤酸碱度要求不严格, pH 值介于 5 ~ 8 之间的土壤中均可种植。它分生能力强, 生长快, 在石竹科品种中常夏石竹为植株最矮、花期限最长、最耐寒旱、寿命最长的种类<sup>[1]</sup>。

常夏石竹根系庞大, 可防止土壤冲刷和水土流失, 并能抗病虫害和有害气体(如二氧化硫和氯气), 凡有毒气的地方可以多种, 有重要的卫生环保功能, 可作为园林的重要组成部分, 也可用于高速公路、高架公路等路基、路坡等多种场所的绿化美化<sup>[1,3]</sup>。

常夏石竹的繁殖方法主要是分株和分蘖, 但难以快速大量繁殖, 这也是当前常夏石竹种苗较贵的重要原因之一。另外经过多代的分株繁殖, 植株体内毒素大量积累, 影响植株健壮生长<sup>[1,3]</sup>。目前有关常夏石竹的快速大量繁殖的研究报道很少<sup>[1,4]</sup>, 该试验采用常夏石竹的茎段

进行离体快速繁殖, 探讨了适宜常夏石竹茎段快速繁殖的培养基, 以期完善常夏石竹的组培快繁技术。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

常夏石竹, 购自广东湛江赤坎花卉市场。

### 1.2 主要试剂和仪器设备

MS 培养基、2,4-D、6-BA、KT、IAA、IBA、NAA、NaOH、升汞、蔗糖、琼脂、乙醇。

高压蒸汽灭菌锅、无菌操作台、无菌室、紫外灯。

### 1.3 培养条件

培养基采用固体培养基, 琼脂浓度 8.5 g/L 及不同种类和浓度的外源激素, 蔗糖浓度 30 g/L, pH 值 5.8, 光照 16 h/d, 培养温度 25℃。

### 1.4 方法

**1.4.1 无菌苗的培养** 取种植的常夏石竹幼嫩枝条在流水下冲洗 2 ~ 3 次, 剪去叶片, 用滤纸或纱布吸去表面水分后, 在超净工作台上, 先用 70% 的乙醇浸泡 30 s, 倾出乙醇, 再用 0.1% 升汞 (0.1 g 升汞加 100 mL 蒸馏水) 浸泡 8、9、10、11、12 min, 倾出升汞, 最后用无菌水冲洗数次, 置无菌纱布中吸干水分, 切成约 1 cm 长带节的茎段接种到腋芽增殖: MS+0.5、1.0、1.5 mg/L 6-BA+0.1、0.5 mg/L NAA 培养基上, 3 d 后观察消毒效果, 2 周后根据腋芽萌发状况找出适宜的腋芽增殖培养基。培养基以 MS 为基本培养基, 添加不同浓度的 NAA 和 6-BA, 共计 6 个处理, 每个处理 5 瓶, 重复 5 次 (见表 1)。

表 1 腋芽增殖培养基

编号	NAA/ mg · L <sup>-1</sup>	6-BA/ mg · L <sup>-1</sup>
1	0.1	0.5
2	0.1	1.0
3	0.1	1.5
4	0.5	0.5
5	0.5	1.0
6	0.5	1.5

**作者简介:** 宛淑艳 (1968-), 女, 黑龙江省肇东人, 理学博士, 讲师, 现从事植物转基因方向研究工作。E-mail: yuanyuanwen-2005@163.com。

**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目 (30270854; 30340049)。

**收稿日期:** 2008-12-13

1.4.2 愈伤组织的诱导 选取无菌苗幼嫩的叶片、茎段 接种到下述培养基上进行愈伤组织的诱导。培养基以 MS 为基本培养基, 添加不同浓度的 2, 4-D 和 6-BA, 共计 4 个处理, 每处理 5 瓶, 重复 5 次(见表 2)。

表 2 愈伤组织诱导培养基		
编号	2,4-D/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	6-BA/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
1	0.5	0
2	0.5	0.1
3	1.0	0.2
4	1.0	0.5

1.4.3 愈伤组织再分化 以 MS 为基本培养基 添加不同浓度的 KT 和 IAA, 共计 3 个处理, 进行愈伤组织的分化培养, 每次处理 5 瓶, 重复 5 次(见表 3)。

表 3 愈伤组织再分化培养基			
编号	6-BA/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	KT/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	IAA/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
1	0.5	0	0.1
2	0.5	4	0.01
3	0.2	4	0.02

1.4.4 根的诱导 生根培养基选用 1/2MS 培养基, 添加不同浓度的 NAA 和 IBA, 共计 4 个处理, 每处理 5 瓶, 重复 5 次(见表 4)。

表 4 生根培养基		
编号	IBA/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	NAA/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
1	1.0	0.005
2	1.0	0.01
3	1.0	0.05
4	1.0	0.1

2 结果与分析

用 0.1%的升汞分别浸泡常夏石竹幼嫩茎段 8、9、10、11、12 min, 3 d 以后经 8、9 min 处理的茎段染菌, 而经 10、11、12 min 处理的茎段没有发现污染(见表 5), 考虑到升汞对外植体的副作用, 试验最终采用 0.1%的升汞浸泡 10 min 消毒常夏石竹。将消毒好的茎段切成 1 cm 长带茎节的小段, 接入腋芽增殖培养基上。1 周左右, 茎节处叶原基萌发, 3 周以后小苗长大, 叶片展开, 茎节开始明显, 30 d 苗高 5~6 cm, 根据上述几个培养基试验对比(见表 6)得出, 用 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA 培养基诱导的腋芽萌发出的小苗茎健壮 茎节明显, 为生长状态较好的无菌苗。将无菌苗的茎切成带节的小段, 接种于上述培养基, 可继代获得大量无菌苗(见图 1、2)。

表 5 不同消毒时间茎段的污染情况		
消毒剂	消毒时间/min	茎段染菌情况(3 d后)
0.1%升汞	8	染菌
0.1%升汞	9	染菌
0.1%升汞	10	无污染
0.1%升汞	11	无污染
0.1%升汞	12	无污染

表 6 不同激素组合对腋芽形成的影响

激素组合/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$			腋芽生长状况(3 周后)
6-BA	NAA	生长状态	
0.1	0.5	+	苗嫩绿、茎细弱, 茎节不明显, 苗高约 2~3 cm
0.1	1.0	+++	苗嫩绿、茎健壮、茎节明显, 苗高约 3~4 cm
0.1	1.5	++	苗嫩绿、茎节明显, 苗高约 2~3 cm
0.5	0.5	—	不长苗
0.5	1.0	+	苗嫩绿、茎细弱, 茎节不明显, 苗高约 2~3 cm
0.5	1.5	+	苗嫩绿、茎细弱, 茎节不明显, 苗高约 2~3 cm

通过试验得出叶的诱导一般较迟钝, 且由于常夏石竹叶片薄, 切割后伤口小, 形成愈伤缓慢, 诱导出的愈伤颜色深绿, 较紧实。而从茎节处诱导出的愈伤生长快 且愈伤组织较大, 质地疏松, 状态好, 有利于迅速分化出芽。因而选取常夏石竹有节的茎段作为最佳外植体。根据颜色和质地的致密 愈伤组织大致可以分为黄褐色、疏松、透明和碧绿、致密 2 种类型<sup>[5]</sup>, 根据观察记录 15 d 以后, 用叶片和无节茎段作为外植体诱导出的愈伤生长缓慢, 颜色深绿, 紧实(见表 7), 而从茎节处形成的愈伤在 MS+1.0 mg/L 2, 4-D+0.5 mg/L 6-BA 培养基上愈伤的诱导率达 95%以上, 且愈伤组织较大, 生长快 质地疏松, 颜色浅绿, 色泽亮丽。这种愈伤有利于迅速分化出芽(见表 8)。另外, 观察发现, 有些愈伤表面长有似根的毛状体, 这种逆向分化会抑制分化苗的出现(如图 2、3)。

表 7 不同部位的外植体对愈伤形成的影响

外植体	生长状况	愈伤组织生长状况(2 周后)
叶片	—	愈伤组织很小, 生长很慢 颜色深绿、紧实
无节茎段	+	愈伤组织较小, 生长较慢 颜色深绿、紧实
有节茎段	++	愈伤组织较大, 生长快, 颜色浅绿 质地疏松

表 8 不同激素组合对愈伤组织形成的影响

激素组合/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$			愈伤组织生长状况(2 周后)
2,4-D	6-BA	生长状况	
0.5	0	—	愈伤组织深绿色, 生长很慢 质地致密
0.5	0.1	+	愈伤组织黄绿色, 生长较慢 质地致密
1.0	0.2	++	愈伤组织黄绿色, 生长缓慢 质地疏松
1.0	0.5	+++	愈伤组织浅绿色, 生长快, 质地疏松

由 2, 4-D 诱导出的愈伤组织, 难以自行分化出芽, 需要转移到不含 2, 4-D 成分的培养基上进行芽的诱导<sup>[6]</sup>。根据表 3 的诱导分化培养基配置表进行试验, 培养 1 周后, 每种处理愈伤的再分化区别不明显。10 d 后, 在 MS+0.2 mg/L 6-BA+4 mg/L KT+0.02 mg/L IAA 培养基上愈伤分化率达 94.8%, 其他各组分化数量少, 长势缓慢, 有的分化芽甚至萎缩。结果表明 KT 浓度为 4 mg/L 时愈伤分化较好, 配合其他植物生长调节剂使用, 效果更好。另外, 组织内细胞分裂素/生长素的比值适宜时, 才能诱导出形态及状况较佳的分化苗<sup>[7]</sup>。试验得出从茎节处口形成的愈伤在 MS+0.2 mg/L 6-BA+4 mg/L KT+0.02 mg/L IAA 培养基上分化率达 94.8%, 平均每个外植体形成分化苗 2.5 个, 是较为适宜

的常夏石竹离体再生培养体系(如图 5、6、表 9)。

表 9 不同激素组合诱导分化芽的生长情况

激素组合/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$			生长状态	芽的分化及伸长情况(2 周后)
6-BA	KT	IAA		
0.5	0	0.1	—	无分化芽, 有新愈伤组织形成, 呈浅绿色
0.5	4	0.01	+	分化芽数量少, 长约 2~3 cm 有部分分化芽萎缩
0.2	4	0.02	++	分化芽嫩绿、健壮、数量较多, 长约 2~3 cm

待常夏石竹分化苗高达 2 cm 时, 转接到不同激素

浓度配比的生根培养基上(见表 4), 生根培养前 5 d 无光照或弱光照, 后期培养与诱导培养条件相同, 5~7 d 观测 1 次, 于 20 d 后调查生根结果, 结果发现, 于下列培养基中所培养的分化苗 50%都长出了气生根, 但目前并没有发现培养瓶中的愈伤组织分化苗长出根(见表 10), 目前生根培养基正在研究中。



图 1 常夏石竹无菌苗的培养(培养 7 d)



图 2 常夏石竹无菌苗的培养(培养 21 d)



图 3 常夏石竹茎段诱导愈伤组织(诱导 15 d)



图 4 常夏石竹茎段诱导愈伤组织(诱导 15 d)



图 5 常夏石竹愈伤组织分化芽(诱导 15 d)



图 6 常夏石竹愈伤组织分化芽(诱导 15 d)

表 10 不同激素组合诱导分化芽生根的情况

激素组合/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$		生根状况(3 周后)
IBA	NAA	
1.0	0.005	无根
1.0	0.01	无根, 有较多气生根
1.0	0.05	无根, 有少量气生根
1.0	0.1	无根

3 讨论

近几年常夏石竹快繁的通常做法是采用常夏石竹外植体直接诱导出愈伤组织, 再利用愈伤组织诱导出分化苗<sup>[1, 8-10]</sup>, 因为常夏石竹经过多代的分株繁殖, 植株体内毒素大量积累容易形成病虫害, 如: 白绢病等, 影响植株健壮生长<sup>[2]</sup>。试验通过采用腋芽增殖培养基培养出

无菌苗, 可获得无毒的外植体, 再用无毒外植体进行愈伤组织的诱导和愈伤组织的再分化培养, 可获得大量无菌苗。由此可避免直接采用外植体速繁成苗而带来的消毒不彻底, 外植体中带有植物病毒的情况; 而近几年有些常夏石竹快繁的做法则是采用茎尖作为快繁的材料<sup>[8-10]</sup>, 但是茎段在数量上, 取材上的方便性是最优的。

外植体是影响植物离体高频再生体系的主要因素之一, 外植体的类型、取材时间、年龄、极性, 都是其再生的限制因素。许多研究结果表明, 对某一种特定的植物来说, 采用一定的外植体类型, 容易再生出小的植株<sup>[11]</sup>。该试验以常夏石竹的叶片和茎段为外植体, 发现茎段比叶片容易再生不定芽。

不同的外植体诱导愈伤的难易程度以及分化产生再生植株的能力不同。从理论上讲, 植物细胞具有全能性, 所以无论选用植株上哪一部位都能诱导成株。但是张卫芳, 段新玲, 杨其简等人的研究表明, 相同植物的不同组织或者部位在器官发生能力上有相当大的区别<sup>[12-13]</sup>, 该试验的研究结果也验证了这一点。在试验研究过程中发现采用从茎节处诱导形成愈伤的方法效果较好, 但是叶片在数量上, 取材上的方便性是最优的, 因此, 今后探索以叶片为外植体建立其再生体系也是一个很好的办法。

植物生长调节物质, 对于植物离体再生的调节作用非常明显, 作用也最显著。使用的最普遍的是生长素类物质和细胞分裂素类物质。在植物离体再生过程中, 常用的生长素类物质有 2, 4-D、NAA、IBA、IAA 等, 其生理活性强弱顺序为 2, 4-D > NAA > IBA > IAA。植物离体再生, 是外植体体内激素与体外环境中生长调节物质共同作用的结果, 生长调节物质调节着植物离体再生的方向<sup>[11]</sup>。在试验中发现, 在细胞分裂素浓度较高时, 容易形成生长快、致地疏松、颜色浅绿的愈伤, 这种愈伤有利于分化出芽。对常夏石竹而言, 寻求合适的激素组成和配比, 对提高离体再生频率尤为重要。而较高浓度的细胞分裂素有利于常夏石竹愈伤组织不定芽的诱导。

不同细胞分裂素作用机理各异, 因此有许多报道表明不同的细胞分裂素配合使用比单独使用效果更好<sup>[14-15]</sup>。试验也证明了这一点。在分化培养时添加了少量 6-BA 使分化率有所提高。

在诱导形成愈伤组织中, 有的愈伤表面出现了毛状体, 该毛状体可能是气生根, 这还需今后进一步的研究, 并且为提高愈伤分化率需力图避免该现象的发生。

### 参考文献

- [1] 兰伟, 许树成. 组织快繁常夏石竹[J]. 特种经济动植物, 2002, 36(6): 40-41.
- [2] 吕汰, 马平虎, 柴小琴, 等. 常夏石竹的特征特性及其草坪的建植[J]. 甘肃农业科技, 2004(9): 38.
- [3] The plant press. *Dianthus spiculifolius*-Pink[EB/OL]. <http://www.plantpress.com>.
- [4] 李慧, 刘江. 常夏石竹的繁殖方法[J]. 农业科技通讯, 2001(7): 17.
- [5] 曹汝义, 刘国民. 实用植物组织培养技术教程[M]. 兰州: 甘肃科学技术出版社, 1996: 78-81.
- [6] 黄莺, 范燕萍. 石竹愈伤组织诱导及植物再生[J]. 华南农业大学学报, 2003, 2(1): 50-52.
- [7] 谭文澄, 戴策刚. 观赏植物组织培养技术[M]. 北京: 中国林业出版社, 1997: 60-65.
- [8] 兰伟, 蔡健, 冯守平. 常夏石竹的组培与快速繁殖[J]. 林业科研开发, 2006, 20(2): 55-57.
- [9] 兰伟, 许树成. 常夏石竹的组织培养与快速繁殖[J]. 阜阳师范学院学报(自然科学版), 2002, 19(2): 34-35.
- [10] 李慧, 刘江. 特种草坪植物常夏石竹的繁殖方法[J]. 农业科技通讯, 2001(7): 17.
- [11] 金万梅, 尹淑萍, 鲁韧强, 等. 地被石竹组织培养再生体系的研究[J]. 河北林果研究, 2006, 21(2): 124-126.
- [12] 张卫芳, 段新玲. 香石竹组织快繁殖技术初探[J]. 塔里木农垦大学学报, 2000, 12(2): 28-31.
- [13] 杨其简, 周禾, 孙彦, 等. 紫花苜蓿愈伤组织诱导以及组织培养[J]. 北京农学院学报, 2004, 14(2): 28-30.
- [14] 王关林, 方宏筠. 高活性细胞激动素 TDZ 在植物组织培养中的应用[J]. 植物学通报, 1997, 14(3): 47-53.
- [15] 诸葛强, 王婕琛, 黄敏仁, 等. 新疆杨植株再生受体系统的建立[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2003, 27(6): 14.

## Study on The Rapid Propagation Technique for Garden Pink

WAN Shu-yan

(Life Science and Technology College Zhanjiang Normal University, Zhanjiang Guangdong 524048, China)

**Abstract:** The culture medium adjust to rapid propagation for stem section of Garden pink were studied with the tissue culture technique. The result showed that: the axillary bud culture medium was MS+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA; the callus induced culture medium was MS+1.0 mg/L 2, 4-D+0.5 mg/L 6-BA and the differential medium of callus was MS+0.2 mg/L 6-BA+4 mg/L KT+0.02 mg/L IAA.

**Key words:** Garden pink (*Dianthus plummaris* L.); Stem section; Rapid propagation