

# 尖叶石竹组织培养及快繁技术

樊金萍, 柴志坚, 初雪清, 龚束芳\*

(东北农业大学园艺学院, 哈尔滨 150030)

**摘要:** 以尖叶石竹(*Dianthus spiculifolius* Schur)茎尖为植物材料, 通过不同激素与MS培养基配比试验, 筛选出尖叶石竹茎尖的愈伤组织诱导与植株再生的最适培养基, 建立尖叶石竹植株再生体系。结果表明, 外植体(茎尖)以酒精浸泡5 s, 次氯酸钠浸泡3 min为宜; MS+2, 4-D(2, 4-二氯苯乙酸) 2.5 mg·L<sup>-1</sup>+6-BA(6-苄氨基嘌呤) 1 mg·L<sup>-1</sup>诱导愈伤组织的效果最好; 用此培养基继续培养可得不定芽; 不定芽接种于MS培养基15 d可产生根系; 株高约6 cm生根苗移栽于河沙中成活率可达90%以上; 在一个繁殖周期内尖叶石竹的增殖倍数约300倍。

**关键词:** 尖叶石竹; 组织培养; 愈伤组织

**中图分类号:** S681.5

**文献标识码:** A

近年来, 随着园林绿化事业的发展和扩大, 传统草坪养护耗水量大、管理费用高与我国各地不同程度的水资源匮乏的矛盾越来越突出。这给广大园林工作者带来极大的困惑, 也制约了我国园林绿化事业的发展。尖叶石竹是石竹科、石竹属的多年生草本花卉植物, 原产西伯利亚等地。植株丛生, 匍匐状, 株高低矮, 与近百种石竹相比, 茎叶较其他石竹细, 叶长5 cm、宽0.2 cm, 簇生, 长线型, 端部尖, 整体外观感如早熟禾类草坪, 单墩地径可达50 cm左右, 它自然控制株高在8~10 cm以内, 适合替代大面积草坪栽种。尖叶石竹以其节水、耐旱, 多色彩、花期长, 抗寒, 绿期长, 栽种方法简单多样, 抗盐碱, 耐贫瘠, 养护管理成本低等优点具有在我国东北地区推广应用的價值。适合栽种在大型绿地、地下设施的地面绿化、屋顶绿化、道路绿化、庭院绿化等, 尤其适合公路两侧、河道护坡、起伏土丘、不易浇灌修剪的山坡等地段。

然而尖叶石竹应用常规繁殖方法进行繁育的成活率较低, 即使是常规繁殖中繁殖效果最好的扦插繁殖也存在着生根慢、易产生枯死苗的缺点,

组织培养技术以其操作方法简单、繁殖率高、成本较低、适合大量繁殖等优点已经成为现代许多商品花卉生产的主要繁殖方法之一。因此研究尖叶石竹的繁殖技术具有很大的经济意义并将对尖叶石竹其他方面的研究起指导性作用。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

本研究以从北京良乡绿景苗木种植中心引进、并经1年露地驯化栽培的健康尖叶石竹成株为材料。取茎尖为外植体。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 外植体的处理

取健康尖叶石竹茎尖于洗衣粉水中浸泡1 h左右, 用自来水冲洗干净后置超净工作台中心灭菌。本试验参照杜雪玲等的方法采用了75%酒精与2%次氯酸钠组合<sup>[1]</sup>: 用75%酒精对外植体(茎尖)分别消毒3、5、8 s后用无菌水冲洗4~5遍, 再用2%次氯酸钠对外植体(茎尖)分别消毒3、5 min后用无菌水冲洗4~5遍, 共6个组合, 每个组合外植体接种10瓶(见表1)。

#### 1.2.2 尖叶石竹愈伤组织及不定芽诱导

选用MS为基本培养基, 参照金万梅、陈利萍等的方法分别设计了诱导愈伤组织5个激素组合和诱导不定芽9个激素组合<sup>[2-3]</sup>。从中筛选出尖叶石竹愈伤组织及不定芽诱导的最适激素组合。

收稿日期: 2006-09-05

基金项目: 黑龙江省教育厅项目(115111037); 东北农业大学大学生科技创新项目

作者简介: 樊金萍(1972-), 女, 黑龙江人, 博士, 讲师, 主要从事园林植物育种及生物技术研究工作。

\* 通讯作者 E-mail: shufanggong@yahoo.com.cn

表 1 75%酒精和 2%次氯酸钠对尖叶石竹茎尖灭菌的影响

Table 1 Effect of 75% alcohol and 2% NaClO on the disinfection of shoot tip of *Dianthus spiculifolius* Schur

培养基代号 No.	75%酒精灭菌时间(s) Disinfectant time of 75% alcohol	2%次氯酸钠灭菌时间(min) Disinfectant time of 2% NaClO	接种个数 No. of explants	成活个数 No. of survival	成活率(%) Surviving rate
1	3	3	10	4	40
2	3	5	10	2	20
3	5	3	10	8	80
4	5	5	10	2	20
5	8	3	10	4	40
6	8	5	10	2	20

### 1.2.3 继代培养

愈伤组织与不定芽均采用 1.2.2 选出的最佳培养基进行继代培养<sup>[4]</sup>。整个培养过程始终将材料培养于 HPG-280H 智能人工气候培养箱中, 设置如下: 光照每日 14 h(4:00~18:00), 光照强度为 3 档, 湿度 55%, 温度 20~24 ℃, 其中 10:00~13:00 光照强度为 4 档。

### 1.2.4 根系的诱导及组培苗的驯化、移栽

将不定芽直接接种于 MS 培养基中进行根系的诱导<sup>[5]</sup>。练苗后以河沙作为培养土进行露地移栽<sup>[6-7]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同消毒时间对外植体灭菌的影响

由表 1 可见, 6 个组合均可起到对外植体的灭菌作用, 其中酒精灭菌 5 s, 次氯酸钠灭菌 3 min 效

果最好, 成活率可达到 80%, 为最优组合。茎尖接种后长势较好, 接种 1 周后高度比接种前平均提高 1 cm 左右, 同时直径增大, 并且均未出现黄化等不良现象, 其中还有少部分茎尖产生了根毛。可见尖叶石竹较适合于应用组织培养技术进行快速繁殖。

### 2.2 愈伤组织的诱导

#### 2.2.1 不同激素浓度对愈伤组织诱导率的影响

结果见表 2。

由表 2 可以看出, 5 种组合中 1、3、4、5 均可诱导出愈伤组织, 1、5 诱导率较低不足 50%, 3、4 诱导率较高, 3 号(2, 4-D 2.5 mg·L<sup>-1</sup>+6-BA 1 mg·L<sup>-1</sup>) 效果最显著, 达到 92.3%。并且启动后 30 d 即可诱导出愈伤组织(见图 1、2), 为最佳愈伤诱导激素组合。在一定的范围内随着 6-BA 浓度的增加, 愈伤组织的诱导率有下降趋势。

表 2 6-BA 和 2, 4-D 对尖叶石竹愈伤组织形成的影响

Table 2 Effect of 6-BA, 2, 4-D on the formation of callus

培养基代号 No.	6-BA (mg·L <sup>-1</sup> )	2, 4-D (mg·L <sup>-1</sup> )	接种数 No. of explants	愈伤组织数 No. of calli formed	诱导率(%) Induction rate
1	0.5	2.5	13	1	7.7
2	0.5	5.0	12	0	0
3	1.0	2.5	13	12	92.3
4	2.0	2.5	13	8	61.5
5	3.0	2.5	13	4	30.7

#### 2.2.2 愈伤组织的细胞学观察

愈伤组织继代培养过程中, 部分大块愈伤组织上部产生了少量颗粒极小的小球型愈伤组织, 颜色为接近无色的淡绿色, 怀疑其为胚性愈伤组织。对其做石蜡切片并进行细胞学观察<sup>[8]</sup>, 显微观察结果表明, 该愈伤组织中存在一些体积较小、细胞质

浓、细胞核大、核质比高、在切片中染色较深的分生细胞(见图 3、4)。可见该愈伤组织具有旺盛的分裂能力, 但并未观察到明显的胚性愈伤细胞的特征, 故确定为非胚性愈伤。

#### 2.3 不同激素浓度对不定芽诱导的影响

结果见表 3。



图 1 愈伤组织的启动

Fig. 1 Formation of callus

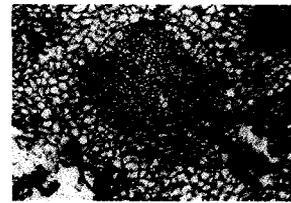


图 3 愈伤细胞内分生细胞团

Fig. 3 Meristematic cells in callus



图 2 诱导 30 d 后的愈伤组织

Fig. 2 Callus induced after 30 days



图 4 愈伤细胞内部形成了大量的分生细胞团

Fig. 4 Abundant meristematic cells formed in callus

表 3 KT、NAA、6-BA 和 2, 4-D 对尖叶石竹不定芽形成的影响

Table 3 Effect of different concentration of KT, NAA, 6-BA, 2, 4-D on the differentiation of callus

培养基代号 No.	6-BA (mg·L <sup>-1</sup> )	2, 4-D (mg·L <sup>-1</sup> )	KT (mg·L <sup>-1</sup> )	NAA (mg·L <sup>-1</sup> )	接种数 No. of explants	不定芽数 No. of buds	诱导率(%) Induction rate
1	3.0	0.00			13	0	0
2	3.0	0.25			12	2	15.4
3	3.0	0.50			13	4	30.8
4	1.0	2.50			13	9	69.2
5	2.0	2.50			13	2	15.4
6	3.0	2.50			13	3	23.1
7			0.5	0.00	11	0	0
8			0.5	0.05	10	0	0
9			0.5	0.10	13	1	7.7

由表 3 可见, 9 个组合中, 2、3、4、5、6、9 均可以诱导出不定芽, 但除 4 外其余组合的诱导率都较低, KT+NAA 的组合几乎不可诱导出不定芽。2, 4-D 2.5 mg·L<sup>-1</sup>+6-BA 1 mg·L<sup>-1</sup> 为不定芽诱导激素组合, 在一定范围内随着 2, 4-D、6-BA 浓度的增加, 芽的诱导率有增加的趋势。无论是使用 2, 4-D 还是 NAA 随着生长素浓度的增加不定芽的诱导率均有上升的趋势。诱导过程中无论使用哪种组合皆有少量畸形芽出现, 原因和克服方法还需进一步讨论。

#### 2.4 不同激素浓度对不定芽生根的影响

根据 2.1 中将茎尖直接接于 MS 培养基即可诱导出根毛的结果, 将不定芽接种在 MS 培养基上 2 周后同样观察到根毛(见图 5)。用该培养基持续培

养 30 d 后大部分不定芽均可生根。

a. 不定芽  
a. Adventitious budsb. 不定芽诱导出的根毛  
b. Roots induced from the buds

图 5 不定芽生根情况

Fig. 5 Rootage of the adventitious buds

#### 2.5 植株的移栽和驯化

生根植株高 6 cm 左右后进行练苗, 1 周后即

可进行露地移栽。移栽基质选择河沙,成活率可达 90%以上。水肥管理是种苗成活的关键。尖叶石竹是耐旱植物,对灌溉的要求不高,如需尽快成坪则可提高灌溉量并适当施加有机肥或化肥。

### 3 讨 论

尖叶石竹的组织培养基本方法为酒精灭菌 5 s,次氯酸钠灭菌 3 min。2, 4-D  $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +6-BA  $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 诱导愈伤组织的效果最好,30 d 后就可诱导出愈伤组织,用此培养基继续培养即可得不定芽,在一定的范围内随着 6-BA 浓度的增加,愈伤组织的诱导率有下降的趋势。无论是使用 2, 4-D 还是 NAA 随着生长素浓度的增加不定芽的诱导率均有上升的趋势。不定芽接种于 MS 培养基后 15 d 后就可以观察到根系的发生。芽的诱导过程中出现了少量的畸形芽,原因和克服方法需进一步探讨。尖叶石竹生根苗露地移栽后成活率较高可达 90%以上,其利用组织培养技术进行繁殖的繁殖率较高,在本试验中尖叶石竹约 60 d 左右即可完成一个繁殖周期,其增殖倍数可达 300 倍以上,可见

尖叶石竹应用组织培养技术进行繁殖的繁殖率相当高,这为尖叶石竹组织培养技术的推广和应用提供了理论依据。

### [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] 杜雪玲,张振霞,余如刚.植物组织培养中的污染成因及其预防[J].草业科学,2005(1):24-27.
- [ 2 ] 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,2006,21:124-126.
- [ 3 ] 陈利萍,王艳菊,葛亚明,等.石竹科植物的组织培养与细胞工程[J].细胞生物学杂志,2005,27:545-548.
- [ 4 ] 李俊明.植物组织培养教程[M].2版.北京:中国农业大学出版社,2002.
- [ 5 ] 张颖.唐菖蒲原生质体分离、纯化及培养的研究[D].哈尔滨:东北农业大学,2006.
- [ 6 ] 潘瑞炽.植物组织培养[M].广州:广东高等教育出版社,2000.
- [ 7 ] 曹致义,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,2001.
- [ 8 ] 李正理.植物制片技术[M].北京:科学出版社,1978.

## Study on tissue culture and rapid propagation of *Dianthus spiculifolius* Schur

FAN Jinping, CHAI Zhijian, CHU Xueqing, GONG Shufang

(College of Horticulture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

**Abstract:** This experiment took the stem apex of the *Dianthus spiculifolius* Schur as material, set up the most efficient callus tissue regeneration and direct regeneration system based on MS medium which supplemented with the different concentration of phytohormone. The results shows that the most suitable disinfect time properly was 5 s by alcohol and 3 min by NaClO respectively; the most efficient culture medium which induced the generation of callus tissue was MS medium supplemented both  $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) and  $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-benzylaminopurine (6-BA). The indefinite buds were achieved on the culture medium, the roots were promoting on MS medium for 15 d. Transplanted in the fluvial sand when the height of plant was about 6 cm, the survival rate can achieve more than 90%. The protocol multiple of *Dianthus spiculifolius* Schur was about 300 in one breeding cycle.

**Key words:** *Dianthus spiculifolius* Schur; tissue culture; callus