

香根草不同外植体诱导体细胞胚胎发生和器官发生

马国华, 夏汉平, 羨蕴兰

(中国科学院华南植物研究所, 广东 广州 510650)

摘要: 以禾本科植物香根草 (*Vetiveria zizanioides*) 的嫩叶鞘基部切段为外植体, 再取其试管苗的基部切段诱导体细胞胚胎发生和芽的器官发生。结果表明生长素是诱导外植体脱分化和形成体细胞胚的关键因子, 而芽的形成则源于体细胞胚的萌发, 它们是由 NAA 或低浓度的 2,4-D 所诱导的。通过研究建立了有效的香根草循环诱导再生体系和试管苗繁殖体系, 为进一步研究香根草的生物技术奠定了良好的基础。

关键词: 香根草; 体细胞胚胎发生; 器官发生

中图分类号: Q943.1

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2000)01-0055-05

SOMATIC EMBRYOGENESIS AND SHOOT FORMATION FROM EXPLANTS OF *VETIVERIA ZIZANIOIDES*

MA Guo-hau, XIA Han-ping, XIAN Yun-lan

(South China Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

Abstract: The explants of young sheath and *in vitro* basal shoot fragments of vetiver (*Vetiveria zizanioides*) were used to study the somatic embryogenesis and shoot formation. The results showed that auxin was the key factor for the induction of somatic embryogenesis from the explants. Shoot organogenesis originated from the germination of somatic embryos which could be induced on induction media supplemented with NAA or low concentration of 2,4-D. An efficient recycle induction, regeneration and propagation system of vetiver were established.

Key words: *Vetiveria zizanioides*; Somatic embryogenesis; Shoot formation

香根草为产于热带地区的禾本科多年生草本植物, 过去其主要用途是从根系提取香根草油。由于香根草具有强大的根系以及对环境有较强适应性, 可在水土保持和复合农林业起重要的作用^[1,2], 近几年受到国内外的广泛重视并得到迅速的推广。目前国内对香根草的需求较大, 种苗供不应求。由于香根草不能正常结实, 通常是通过分蘖方式进行繁殖的。为加快香根草的种苗繁殖以及筛选矮化、抗重金属盐等的突变体, 我们开展了其组织培养工作。

有关香根草组织培养方面的研究, 目前已有通过香根草基部组织诱导愈伤组织及其植株再生的报道^[3]。而通过香根草嫩叶鞘和试管苗基部切段外植体进行组织培养的研究以及香根草直接诱导体细胞胚胎发生和器官发生的研究, 国内外尚未见报道。

1 材料和方法

外植体 供试材料来源于本所香根草 (*Vetiveria zizanioides*) 栽培试验基地。拔起正常生长的香根草, 剥取其基部白色嫩叶鞘作为外植体, 经消毒和无菌水清洗后, 接种于含不同配比生长调节剂的 MS¹⁴ 固体培养基上暗培养。固体培养基含琼脂 6.0%, pH 值为 5.8, 培养温度 $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ 。暗培养 7 d 后, 将培养瓶转移到光照条件 (1 100 lx) 下继续培养。观察外植体愈伤组织的诱导和器官发生等情况。

嫩叶鞘外植体在诱导培养基上培养 20 d 后, 将含有绿芽的愈伤组织转移到含 1.0 mg L^{-1} BA 和 0.1 mg L^{-1} NAA 繁殖培养基上照光培养以诱导出芽。20 d 后, 切取试管苗基部 0.5 cm 长的一段组织, 接种于不同生长调节剂配比的固体培养基上暗培养, 培养条件同上。观察外植体脱分化及愈伤组织的诱导及体细胞胚胎发生和芽的器官发生等情况。

将愈伤组织转移到不同培养基上培养, 进一步诱导愈伤组织或芽的形成。试管苗在含 0.2 mg L^{-1} IBA 的培养基上光照培养一个月, 待其形成根系后, 取出并洗净, 将试管苗直接移栽到沙盆或试验地。观察植株生长情况。

2 实验结果

2.1 从嫩叶鞘外植体直接诱导体细胞胚胎发生和器官发生

嫩叶鞘外植体在含有 $1-10 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D 的诱导培养基上暗培养 6-8 d 后, 在其切口部位长出淡黄色的松散型的愈伤组织 (图版 I:1)。随着培养时间的延长, 逐渐形成颗粒状的愈伤组织 (图版 I:2) 和胚状体结构, 但尚未观察到芽的形成。在含 1.0 mg L^{-1} NAA 或 1.0 mg L^{-1} NAA 与 1.0 mg L^{-1} BA 配合的培养基, 形成的愈伤组织较少, 外植体在诱导培养基上培养 8-10 d 后, 所诱导的体细胞胚直接萌发形成丛生芽 (图版 I:3)。在 0.1 mg L^{-1} NAA 与 1.0 mg L^{-1} BA 配合的培养基上, 形成愈伤组织极少, 外植体在培养 8-10 d 后直接形成经体细胞胚萌发形成丛生芽。单独使用 1.0 mg L^{-1} BA 或 KT, 不能诱导出愈伤组织或芽的形成 (表 1)。

表 1 从香根草嫩叶鞘外植体直接诱导器官发生

Table 1 Shoot formation directly induced from explant of young sheaths of vetiver

生长调节剂浓度 Growth regulators (mg L^{-1})	诱导结果 Induction results	愈伤组织诱导频率 Frequency of callus induction (%)	器官发生频率 Frequency of shoot formation (%)
1.0 2,4-D	愈伤组织, 无芽 Callus, no shoots	78.1c	0a
1.0 NAA	较少愈伤组织, 有芽 Less callus, with shoots	70.8c	50.0d
1.0 NAA, 1.0 BA	较少愈伤组织, 有芽 Less callus, with shoots	63.1c	36.8c
0.1 NAA, 1.0 BA	较少愈伤组织, 有芽 Less callus, with shoots	7.2b	7.2b
1.0 BA or 1.0 KT	无愈伤组织 No callus	0a	0a

每个处理的外植体数量为 70-100, 重复两次。通过 LSD(0.05) 分析, 同一栏中字母相同的表示无差异显著性。Values are means from two replications of each experiment using 70 to 100 explants per treatment. The same letter in the column denotes no significant difference by LSD (0.05) test.

2.2 从试管苗基部切段外植体直接诱导体细胞胚胎发生和器官发生

以离体培养的香根草的基部切段为外植体, 在不同配比的培养基上暗培养 2 星期后(2), 只有在含生长素的培养基上才能诱导出愈伤组织。低浓度的 2,4-D 或 NAA 能够在愈伤组织表面直接诱导出芽(图版 I: 5)。而对于较高浓度 2,4-D ($4-10 \text{ mg L}^{-1}$) 或 NAA (40 mg L^{-1}) 所诱导的愈伤组织, 不能直接诱导出芽, 但通过显微观察, 在愈伤组织表面可观察到体细胞胚的形成(图版 I: 4)。

在含有 1.0 mg L^{-1} NAA 配合 1.0 mg L^{-1} BA、和单一的 1.0 mg L^{-1} BA 或 1.0 mg L^{-1} KT 的培养基上, 不能诱导出愈伤组织。随着培养时间的延长, 部分外植体直接形成 1-2 个芽。这些芽来自原有的试管苗基部切段芽分生组织的生长(表 2)。

表 2 从香根草试管苗基部组织直接诱导芽的器官发生
Table 2 Shoot formation directly induced from basal shoot fragments

生长调节剂浓度 Growth regulators (mg L^{-1})	观察结果 Observation results	平均每个外植体所能诱导的芽数量 Average shoot numbers per explant
4.0 2,4-D	愈伤组织, 有体细胞胚 Callus, with somatic embryos	0 a
1.0 2,4-D	愈伤组织, 有芽 Callus, with shoots	28.3 c
40 NAA	愈伤组织, 有体细胞胚 Callus, with somatic embryos	0 a
1.0 NAA	愈伤组织, 有芽 Callus, with shoots	25.8 c
1.0 NAA, 1.0 BA	有芽, 无愈伤组织 Shoot, no callus	1.6 b
1.0 BA	有芽, 无愈伤组织 Shoot, no callus	1.7 b
1.0 KT	有芽, 无愈伤组织 Shoot, no callus	1.2 b

每个处理的外植体数量为 70-100, 重复两次。通过 LSD(0.05) 分析, 同一栏中字母相同的表示无差异显著性。Values are means from two replications of each experiment using 70 to 100 explants per treatment. The same letter in the column denotes no significant difference by LSD (0.05) test.

表 3 愈伤组织在不同继代培养基上的生长和芽的形成
Table 3 Growth and development of vetiver callus on subculture media

继代培养基 Subculture media (mg L^{-1})	观察结果 Observation results	每块愈伤组织所形成的芽数量 Shoot numbers per callus
4.0 2,4-D	愈伤组织 Callus	0 a
1.0 2,4-D	愈伤组织, 有芽 Callus, with shoots	38.1 c
10 NAA	愈伤组织, 有芽 Callus, with shoots	24.5 bc
1.0 NAA	愈伤组织, 有芽 Callus, with shoots	21.2 bc
1.0 BA, 1.0 NAA	愈伤组织, 有芽 Callus, with shoots	14.4 b
1.0 BA	芽 Shoots	15.3 b

每个处理的外植体数量为 70-100, 重复两次。通过 LSD(0.05) 分析, 同一栏中字母相同的表示无差异显著性。Values are means from two replications of each experiment using 70 to 100 explants per treatment. The same letter in the column denotes no significant difference by LSD (0.05) test.

2.3 愈伤组织的继代培养和芽的形成

将嫩叶鞘外植体或试管苗芽基部切段的愈伤组织转移到不同培养基上培养(表 3), 可见对于 $4-10 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D 或 40 mg L^{-1} NAA 所诱导的愈伤组织, 在转移至不同培养基上培养后, 愈

伤组织均能增殖, 但含高浓度的 2,4-D 的培养基, 仍然不能诱导出芽。而当这些愈伤组织转移至含低浓度或低活性的生长素或含细胞分裂素的培养基上培养时, 均能分化出芽, 出芽率均为 100%。

愈伤组织在含 1.0 mg L^{-1} BA 和 1.0 mg L^{-1} NAA 的培养基上培养时, 在不断分化出芽的同时, 愈伤组织还不断的增殖。将带有芽的愈伤组织在此培养基上继代培养时, 可不断地形成新的愈伤组织和芽(图版 I: 6)。

将含有芽的愈伤组织转移到繁殖培养基 (1.0 mg L^{-1} BA 和 0.1 mg L^{-1} NAA) 上培养 20 d 后, 愈伤组织块分化出大量的丛芽(图版 I:7)。

2.4 从丛芽基部切段循环诱导愈伤组织和芽的形成

在试验中, 以丛芽的基部切段为外植体, 在含 2,4-D 或 NAA 的诱导培养基上可进一步诱导愈伤组织和芽的形成。这系列过程可反复循环, 均可诱导高频率的愈伤组织和芽的形成。通过这一途径也可进行愈伤组织的重复诱导和芽的大量繁殖。

2.5 再生和移栽

将芽转移到含 0.5 mg L^{-1} IBA 的培养基上培养 10 d 后, 逐渐长出根。培养一个月后, 将有根的试管苗移栽入盆, 几乎所有的试管苗均能成活(图版 I: 8)。

3 讨论

显然, 生长素是诱导香根草不同外植体产生愈伤组织和体细胞胚胎发生的关键因子。而细胞分裂素对于诱导香根草愈伤组织和体细胞胚胎发生不起作用。这一结果同其它一些植物(如木薯^[6]、大豆^[6]、百合^[7]等)的离体培养的情形基本相同, 但跟以上植物有所不同的是, 香根草不同外植体在诱导培养基上能够直接萌发出芽。在本研究中, 我们观察到外植体培养的芽的形成, 但这种芽的发生实际上是源于体细胞胚在诱导培养基上的直接萌发。其诱导培养基所含的生长素只能是 NAA 或低浓度的 2,4-D。高浓度或高活性的生长素对体细胞胚的萌发形成芽的过程是抑制的。

不同外植体对生长素直接诱导体细胞胚胎发生和器官发生的效果有差异。以香根草嫩叶鞘为外植体时, 在含 1 mg L^{-1} NAA 或 1 mg L^{-1} NAA 加 1 mg L^{-1} BA 的诱导培养基上诱导较少的愈伤组织, 并直接诱导出芽; 在含 1 mg L^{-1} 2,4-D 的培养基上诱导愈伤组织而不直接出芽。而对于以试管苗基部切段为外植体时, 在 1 mg L^{-1} NAA 或 1 mg L^{-1} 2,4-D 的诱导培养基上培养, 在形成大量愈伤组织的基础上, 才逐步形成体细胞胚并直接分化出芽; 而含 1 mg L^{-1} NAA 加 1 mg L^{-1} BA 的培养基不能诱导愈伤组织或诱导丛芽, 显示了同一植物不同外植体对植物生长调节剂诱导和再生的差异性。

由于香根草试管苗基部切段在含生长素的培养基上能够高频率的诱导愈伤组织和芽的形成, 这就为香根草建立了有效的循环培养再生体系。通过本研究, 香根草愈伤组织和试管苗在几个培养基上能够增殖, 为香根草的快繁和抗逆突变体生物工程等工作奠定了基础。

参考文献:

- [1] 夏汉平, 敖惠修, 刘世忠等. 香根草—优良的水土保持植物 [J]. 生态科学, 1997, 16(1):17-24.

- [2] National Research Council. *Vetiver Grass: A Thin Green Line against Erosion* [M]. Washington DC, National Academy Press, 1993.
- [3] Marco M, Marisa G, Silvano S et al. Callus induction and plant regeneration in *Vetiveria zizanioides* [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1993, 35:267–271.
- [4] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture [J]. *Physiol Plant*, 1962, 15:473–497.
- [5] 马国华, 许秋生, 袁蕴兰. 从木薯嫩叶直接诱导体细胞胚胎发生和芽的形成 [J]. *植物学报*, 1998, (6):503–507.
- [6] Rajasekaran K, Pellow J W. Somatic embryogenesis from cultured epicotyls and primary leaves of soybean [J]. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, 1997, 33:88–91.
- [7] 尹东, 黄百渠, 李彦舫. 虎尾万年青的直接体细胞胚胎发生和植株再生 [J]. *植物学报*, 1997, 39(1):59–63.

图版说明

图版 I 从香根草不同外植体直接诱导体细胞胚胎发生和器官发生

1. 嫩叶鞘在含 1 mg L^{-1} 2,4-D 的培养基上暗培养 6 d 后诱导出白色愈伤组织; 2. 嫩叶鞘在含 1 mg L^{-1} 2,4-D 的培养基上暗培养 30 d 后诱导出淡黄色颗粒状愈伤组织; 3. 嫩叶鞘在含 1 mg L^{-1} NAA 的培养基上暗培养 14 d 后直接诱导出体细胞胚及其萌发出芽; 4. 试管苗基部切段在含 4 mg L^{-1} 2,4-D 的培养基上诱导的愈伤组织上观察到体细胞胚; 5. 试管苗基部切段在含 1 mg L^{-1} 2,4-D 的培养基上直接诱导体细胞胚及其萌发出芽; 6. 愈伤组织在含 1.0 mg L^{-1} BA 和 1.0 mg L^{-1} NAA 的培养基上培养不断分化出芽; 7. 在含 1.0 mg L^{-1} 2,4-D 的培养基上诱导的愈伤组织在再生培养式上分化出大量的芽; 8. 试管苗移栽入盆。

Explanation of Plate

Plate I Somatic embryogenesis and shoot formation from explants of *Vetiveria zizanioides*

1. White callus induced from young sheath after 6 days of dark culture on induction medium containing 1 mg L^{-1} 2,4-D;
2. Yellowish granular callus induced from the explant of young sheath after 30 days of dark culture on induction medium containing 1 mg L^{-1} 2,4-D;
3. Somatic embryos and shoots directly induced from the explant of young sheath after 14 days of dark culture on induction medium containing 1 mg L^{-1} NAA;
4. Somatic embryos visible on the 4 mg L^{-1} 2,4-D-induced callus from the explant of basal shoot fragments;
5. Somatic embryogenesis and shoot formation directly induced by 1 mg L^{-1} 2,4-D from the explant of basal shoot fragments;
6. Multiple-shoots constantly redifferentiated from the callus on the medium containing 1.0 mg L^{-1} BA and 1.0 mg L^{-1} NAA;
7. Multiple-shoots developed on the regeneration medium from 1 mg L^{-1} 2,4-D-induced callus;
8. Transplanting of vetiver plants *in vitro*.