

影响香根草体细胞胚胎发生和植株再生因素初探

马镇荣, 杨冰冰, 夏汉平*

(中国科学院华南植物园, 广州 510650)

摘要: 为了探索提高香根草 (*Vetiveria zizanioides*) 遗传种质改良效率的有效途径, 初步研究了影响香根草体细胞胚胎发生和植株再生的若干因素。以 MS 培养基为基本培养基, 附加不同配比的生长素和细胞分裂素, 对香根草的腋芽及无菌不定芽进行离体培养。结果表明, 2,4-D 是诱导体细胞胚胎发生的关键因素, 当培养基中只含 2,4-D 而不含或少含细胞分裂素(6-BA)时, 外植体经由体细胞胚胎发生途径形成再生植株。愈伤组织诱导频率在有的品种之间差异显著, 最高的达到 96.7% (cv. Zomba), 最低的不到 30% (cv. Malaysia); 而有的品种之间差异不显著 (例如 cv. Kandy 和 cv. Sunshine)。胚性愈伤组织的再生能力可以长期保持, 从未经继代培养的到持续继代第 23 代的胚性愈伤组织, 再生频率都在 80% 以上, 而且再生植株的生长良好。在 3-7℃ 的低温下进行分化培养时, 仍然有 40.5%-50.0% 不同世代的胚性愈伤组织还保持着再生能力。

关键词: 香根草; 胚性愈伤; 体细胞胚胎发生; 植株再生

中图分类号: Q943.1

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2006)01-0055-06

Effecting Factors of Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in Vetiver

MA Zhen-rong, YANG Bing-bing, XIA Han-ping*

(South China Botanical Garden, the Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

Abstract: Axillary buds and aseptic adventitious buds of vetiver (*Vetiveria zizanioides* (L.) Nash) were used as explants to investigate the factors that affected somatic embryogenesis and plant generation. The explants were cultured on MS medium supplemented with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) or and 6-benzyladenine (6-BA). The results showed the explants could regenerate via somatic embryogenesis when the medium contained only 2,4-D without or with little content of 6-BA. Callus induction frequency in different cultivars was significantly varied, eg: cv. Zomba had highest induction frequency, up to 96.7%, but cv. Malaysia the lowest, less than 30%, whereas that in cv. Kandy and cv. Sunshine was almost the same. Regeneration ability in embryonic calli could be maintained for a long time, the regeneration frequency being still over 80%, regardless of subculture times from 0 to 23. The differentiation ability of embryonic calli was inhibited at temperature of 3-7℃, under which only 40.5%-50.0% of them could regenerate.

Key words: *Vetiveria zizanioides*; Embryogenic callus; Somatic embryogenesis; Plant regeneration

香根草 *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash 在水土保持、生态环境治理、退化生态系统的恢复, 以及对重金属和污染物的生物修复和土壤基质的改良等方面都有重要的作用^[1-3]。目前香根草的开发利用尚存

在着一定的局限性, 需要通过遗传改良, 选育出矮化、抗旱、耐寒和绿期较长的新品种, 以适应生态工程的需要。采用生物工程的方法, 即体细胞克隆变异或诱变、外源基因的遗传转化等, 是对香根草进

收稿日期: 2005-06-27 接受日期: 2005-11-21

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30370233); 美国 Wallace 基金会资助

* 通讯作者 Corresponding author

行遗传改良的有效途径。

离体培养是生物工程法的基础,是改良任何植物种质的技术前提;体细胞胚胎发生是离体培养的植株再生途径之一,并且是提高再生频率的有效途径^[4,5]。为了提高香根草遗传种质改良的效率,我们对香根草体细胞胚胎发生的细胞学特点进行了研究^[6],本文主要探讨影响其胚性愈伤产生和植株再生的若干因素,为进行品种遗传改良提供参考。

1 材料和方法

材料 香根草 *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash 取自中国科学院华南植物园百草园实验基地。供试的材料包括 Kandy, Karnataka, Malaysia, Sunshine, Randy, Zomba 等香根草品种。离体培养采用两种外植体,一是植株上带腋芽的节,二是由器官发生方式所产生的无菌不定芽。以腋芽作外植体时,切取带节的秆,剥去叶鞘,截取带腋芽的节,表面消毒(70%乙醇 2 min + 20%次氯酸钠 10 min + 0.1%氯化汞 20 min)后,把带有腋芽的节小块接种到培养基上。以无菌不定芽作外植体时,在无菌条件下把不定芽从试管中取出并接种到新的诱导培养基上。

此外,以非胚性愈伤组织和无菌不定芽两种培养物作为供试材料,在含不同配比的生长素和细胞分裂素的诱导培养基中进行培养,以观察体细胞胚的诱导条件。

培养基 以 MS^[7]培养基为基本培养基,诱导器官发生时附加 5.0 mg L⁻¹ BAP 和 0.2 mg L⁻¹ IBA;愈伤组织的诱导和继代时均附加 2.0 mg L⁻¹ 2,4-D,以及不同配比的其他生长调节剂;植株再生时附加 0.1 mg L⁻¹ KT, 2.0 mg L⁻¹ 6-BA 和 2.0 mg L⁻¹ NAA。固体培养基含琼脂 8.0%, pH 值为 5.85。

细胞学观察 把体细胞胚性愈伤组织从培养基中取出并浸泡在甲醇-冰乙酸(3:1)固定液中,然后按石蜡切片的常规方法切片,厚度为 8 μm,用 Ehrlich 氏苏木精染色。封片后在显微镜下观察、照相。

胚性愈伤组织的鉴别 从外植体上诱导出愈伤组织大约需要 2-3 周时间,及时把愈伤组织转移到分化培养基或继代培养基上。一般每两个月继代一次,继代一次称为一个世代,第 n 世代在品种编号后面记作“-n”。例如“4-23”表示 4 号品种(Karnataka)继代第 23 代。

胚性愈伤组织是具有胚状结构的愈伤组织。用

肉眼或解剖镜观察,单个的胚状结构表面光滑,成圆球形或圆柱形,个体之间相对独立。从切片观察,随着球形胚、盾片形胚、芽鞘形胚等发育阶段不同,其形状也有所变化。成熟胚具两极性,胚芽端和胚根端清楚。而非胚性愈伤组织的整体成块状,个体表面粗糙,呈不规则形,分化率低。

植株的再分化、移栽和定植 把胚性愈伤组织转移到分化培养基上,在光照为 12 h d⁻¹(1 200 lx)、温度为 25±2℃下培养。再生植株形成后,在生根培养基中培养约 2 周时间,根系发达即可盆栽。待株高长至 20 cm 左右,定植到旱地里,常浇水以保持湿润。成活后观察植株各种性状。

2 结果和讨论

2.1 体细胞胚性愈伤组织的形成过程

香根草的腋芽在诱导培养基中培养两周后开始膨大,逐步形成愈伤组织。胚性愈伤组织产生后,可以见到许多球状突起(图版 I: A)。胚性细胞的细胞质变浓,细胞分裂加速并形成球形胚,在显微镜下可观察到这部分细胞着色很深(图版 I: B)。香根草的胚性细胞形态上不规则且有棱角。图版 I: B 中有一大一小两个球形胚,它们是否由一个胚性细胞分裂而成,然后各自发展成为胚性细胞团?这是涉及到香根草的体细胞胚是否单细胞起源的问题,有待进一步研究。胚性细胞团与其周围的非胚性细胞形态不同、着色不同,而且产生明显的界线并逐步分离开来(图版 I: C),直到发育成为芽鞘形胚(图版 I: D)。从图版 I: D 看到,香根草体细胞胚具有单子叶植物典型的胚胎结构,在横切面结构中,每个胚状体由胚芽鞘(cp)、胚根鞘(cr)及盾片(sc)组成,还可以观察到一条着色较深的维管束(v)连接在胚根与盾片之间。胚芽鞘、胚根鞘、盾片及其间的维管束组织等四个部分是一个完整的胚状体的必备条件。本研究表明,通过离体培养可以成功地诱导出完整的香根草体细胞胚。

2.2 体细胞胚的诱导条件

以 MS 培养基为基本培养基,设计了 6 种不同生长素和细胞分裂素配比的诱导培养基,分别对两种培养物(非胚性愈伤组织和无菌不定芽)作诱导体细胞胚的试验以观察诱导胚性愈伤的效果。

从表 1 看出,培养基不附加 2,4-D,无论 6-BA 的含量是 0.5 还是 1.0 mg L⁻¹,两种培养物均没有体

表1 生长素和细胞分裂素的不同对比对香根草胚性愈伤组织诱导频率的影响
Table 1 Effects of growth regulators on induction frequency of embryogenic calli of vetiver

2,4-D (mg L ⁻¹)	6-BA (mg L ⁻¹)	培养物类型 Cultures	数量 No. of cultures	胚性愈伤数 No. of E-calli	胚性愈伤组织诱导频率 Induction frequency (%)
0	0.5	C	90	0	0
		B	72	0	0
0	1.0	C	93	0	0
		B	64	0	0
0.5	0	C	90	87	96.7
		B	70	0	0
1.0	0.5	C	97	83	85.6
		B	77	60	77.9
2.0	1.0	C	90	72	80.0
		B	78	30	38.5
4.0	2.0	C	92	50	54.3
		B	90	34	37.8

C= 非胚性愈伤组织 Non-embryogenic callus; B= 无菌不定芽 Aseptic adventitious buds; E-calli= 胚性愈伤组织 Embryogenic callus

细胞胚的产生: 当2,4-D的含量达到4.0 mg L⁻¹时, 45.8%的非胚性愈伤组织和62.2%无菌不定芽不能诱导出体细胞胚。对于非胚性愈伤组织而言, 在附加2,4-D的条件下, 无论是否含有6-BA均可诱导出体细胞胚, 且其诱导频率以2,4-D含量为0.5 mg L⁻¹并不含6-BA的为最高(96.7%)。值得注意的是, 在2,4-D的含量为0.5 mg L⁻¹且不含6-BA的情况下, 无菌不定芽不能诱导出胚性愈伤组织。对于无菌不定芽而言, 诱导培养基的最适配比是1.0 (2,4-D): 0.5 (6-BA), 诱导频率为77.9%, 而且诱导出来的多数胚性愈伤组织的质量都很好。

Mucciarelli等^[8]对香根草以及Liu等^[9]对羊草(*Leymus chinensis*)的研究表明, 2,4-D的浓度对愈伤组织的诱导有很明显的影响。从本实验离体诱导香根草胚性愈伤组织中, 外植体对培养基中的2,4-D和6-BA的反应来看, 2,4-D也有相同的效应。当培养基中只含2,4-D而不含或少含细胞分裂素时, 外植体(腋芽或不定芽)可经由体细胞胚胎发生途径形成再生植株。这一结果也与凌定厚等^[10]对籼稻及Vasil等^[11]对珍珠粟(*Pennisetum americanum*)体细胞胚胎发生研究的结果基本一致。

2.3 不同品种的胚性愈伤组织诱导频率的差异

为了解不同品种的香根草的胚性愈伤组织诱导频率的差异, 在相同培养条件下, 调查了5个品种经两次重复试验的愈伤组织诱导频率。

从表2可看出, 香根草不同品种的愈伤组织诱导频率有的无差异显著性(如表2中字母相同的两个品种), 有的具差异显著性(如表2中字母不同的各品种)。诱导频率最高的达到96.7%(Zomba); 其次是83.5%(Karnataka); 而最低的不到30%(Malaysia)。但是, 尽管愈伤组织诱导频率各不相同, 所有品种的愈伤组织都能产生体细胞胚(图版1:E)。在实验中观察到, 胚性愈伤组织诱导频率的高低与腋芽的发育时期也有一定的关系(资料未显示), 这对于利用特定发育时期的不同品种开展实验, 提供了依据。

表2 香根草不同品种愈伤组织诱导频率的差异
Table 2 Callus induction frequency of vetiver cultivars

品种 Cultivars	外植体数 No. of explants	愈伤组织诱导频率 Induction frequency (%)
Kandy	117	71.7 b
Karnataka	188	83.5 a
Malaysia	102	27.4 c
Sunshine	100	69.0 b
Zomba	237	96.7 a

数据为两个重复试验、接种15 d后的统计结果; 用LSD (0.05)分析, 同一栏中不同字母表示差异显著。Data are means of two experiments in duplicate, which were obtained after inoculation for 15 days. Means within column with different letters are significant at the P=0.05 (LSD test).

2.4 低温对体细胞胚植株再生的影响

香根草属于热带亚热带植物,其本身不具备抗寒的能力,这是香根草在北方生长的主要限制因子。通常情况下,把胚性愈伤组织转入分化培养基以后,在 12 h d⁻¹光照(1 200 lx)和 25±2℃下培养。为了试图通过施加低温选择压以选育耐寒种质,把 3 批不同世代的胚性愈伤组织放在 3-7℃(光照同上)的培养箱里培养,持续时间分别为 98 d、90 d、82 d(表 3)。

表 3 表明,在 3-7℃的条件下,部分胚性愈伤组织不再分化甚至死亡,但有 40.5%-50.0%胚性愈伤组织还保持着再生能力。由于每一块具再生能力的

胚性愈伤组织所产生的植株不止 1 株,因此得到的再生植株数比分化愈伤组织块数多,甚至多出一倍以上。此外,在本实验中还看到,分化频率的高低与低温处理的天数以及胚性愈伤组织的世代不相关。

3-7℃的低温对香根草胚性愈伤组织的分化有一定的影响。这对于离体筛选抗寒种质提供了有益的启示。然而,经过低温处理所获得的再生植株与正常植株相比,在生理生态指标上有何异同?假如把处理的温度下降到 0-3℃,其再生能力是否仍然保持?经过低温胁迫而获得的体细胞克隆是否在抗寒、抗冻能力上比较强?这些问题有待于进一步探讨。

表 3 3-7℃低温处理对香根草 *Karnataka* 胚性愈伤组织再生频率的影响

Table 3 Effects of low temperature (3-7℃) treatment on regeneration frequency of embryogenic calli of vetiver cv. *Karnataka*

世代 Generation	持续天数 Duration (d)	胚性愈伤组织数 No. of E-calli	分化愈伤组织数 No. of differentiation calli	再生频率 Regeneration frequency (%)	再生植株数 Regenerated plantlets
6 th	98	84	34	40.5	78
13 th	90	98	49	50.0	90
16 th	82	280	135	48.2	235

E-calli=胚性愈伤组织 Embryogenic callus

2.5 体细胞胚的植株再生能力

将胚性愈伤组织转入分化培养基,两周即呈绿色并逐渐萌发出芽。在分化初期,可观察到胚性愈伤组织上布满了绿点。这些绿点逐渐发育成为不定芽,诱导出根之后即成为完整的小植株。许多研究已经证明,体细胞胚性愈伤组织在继代条件下,胚性结构及植株再生能力可以长期保持^[12, 13]。而香根草体细胞胚的这种再生能力更强。图版 I: F 及 G 显示,从未经继代培养的(俗称“0代”)到继代 23 代的各个世代的胚性愈伤组织,再生植株的生长情况都非常良好。表 4 显示连续继代两年的胚性愈伤组

织最近半年的再生能力。

凌定厚等^[14]证实,水稻胚性愈伤组织的分化成苗率因继代次数的增加而有所下降。Lu 等^[15]所获得的玉米胚性愈伤组织的分化能力只保持了两个月。而本实验表明,香根草胚性愈伤组织连续继代两年(以至更长时间,数据未显示),它们的再生能力仍然没有明显的下降。这种特性在其他禾本科植物(如水稻)上未见报道。利用香根草的这种特性开展突变体的离体筛选和遗传转化等方面的研究,是十分合适的。

表 4 继代时间对香根草 *Randy* 胚性愈伤组织再生频率的影响

Table 4 Effects of subculture duration on regeneration frequency of embryogenic calli of vetiver cv. *Randy*

继代培养时间 Subculture duration (Month)	胚性愈伤组织数 No. of E-calli	再生胚性愈伤组织数 No. of regeneration E-calli	再生频率 Regeneration frequency (%)
18	400	368	92.00
20	550	509	92.55
22	650	557	85.69
24	750	612	81.60

数据为最近半年中每两个月一次的统计 Data were collected every months in the last six months; E-calli=胚性愈伤组织 Embryogenic callus

致谢 在本文修改过程中,承蒙马国华研究员热情帮助,谨致谢忱!

参考文献

- [1] Summerfelt S T, Adler P R, Gleen D M, et al. Aquaculture sludge removal and stabilization within created wetlands [J]. *Aquacul Engin*, 1999, 19:81-92.
- [2] Chen K (陈凯), Hu G Q (胡国谦), Rao H M (饶辉茂), et al. Ecological effects of planting vetiver grass in citrus groves on sloping red soil fields [J]. *Acta Ecol Sin (生态学报)*, 1994, 14(3): 249-254.(in Chinese)
- [3] Xia H P (夏汉平), Shu W S (束文圣). Resistance to and uptake of heavy metals by *Vetiveria zizanioides* and *Paspalum notatum* from lead/zinc mine tailings [J]. *Acta Ecol Sin (生态学报)*, 2001, 21: 1121-1129.(in Chinese)
- [4] Marco M, Marisa G, Silvano S, et al. Callus induction and plant regeneration in *Vetiveria zizanioides* [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 1993, 35:267-271.
- [5] Ma G H (马国华), Xia H P (夏汉平), Xian Y L (羡蕴兰). Somatic embryogenesis and shoot formation from explants of *Vetiveria zizanioides* [J]. *J Trop Subtrop Bot (热带亚热带植物学报)*, 2000, 8:55-59.(in Chinese)
- [6] Ma Z R (马镇荣), Liu W (刘卫), Wang C H (王昌虎), et al. Cytological observation and formation conditions of somatic embryogenesis in *Vetiveria zizanioides* [J]. *Acta Ecol Sin (生态学报)*, 2003, 23(7):1290-1296.(in Chinese)
- [7] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture [J]. *Physiol Plant*, 1962, 15: 473-497.
- [8] Mucciarelli M, Gallino M, Scannerini S, et al. Callus induction and plant regeneration in *Vetiveria zizanioides* [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 1993, 35:267-271.
- [9] Liu G S, Liu S J, Qi D M, et al. Factors affecting plant regeneration from tissue cultures of Chinese leymus (*Leymus chinensis*) [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 2004, 76:175-182.
- [10] Ling D H (凌定厚), Yosida S. The study of some factors affecting somatic embryogenesis in IR lines of rice [J]. *Acta Bot Sin (植物学报)*, 1987, 29(1):1-8.(in Chinese)
- [11] Vasil V, Vasil I K. Characterization of an embryogenic cell suspension culture derived from cultured inflorescences of *Pennisetum americanum* [J]. *Amer J Bot*, 1982, 69:1441-1449.
- [12] Ling D H (凌定厚), Brar D S, Zapata F J. Cytology and histology in somatic embryogenesis of *Indica* rice [J]. *Acta Bot Sin (植物学报)*, 1988, 30(5):485-489.(in Chinese)
- [13] Vasil V, Vasil I K. Toward the development of a single cell system for grasses [A]. In: IGAS, IRRI. *Cell and Tissue Culture Techniques for Cereal Crop Improvement* [C]. Beijing: Science Press, 1983. 131-144.
- [14] Ling D H (凌定厚), Chen W Y (陈琬琰), Chen M F (陈梅芳), et al. A study of induction and plantlet differentiation of embryonic cluster of trihaploid rice [J]. *Acta Genet Sin (遗传学报)*, 1984, 11(1):26-32.(in Chinese)
- [15] Lu C, Vasil I K, Ozias-Akins P. Somatic embryogenesis in *Zea mays* L. [J]. *Theor Appl Genet*, 1982, 62:109-112.

图版说明

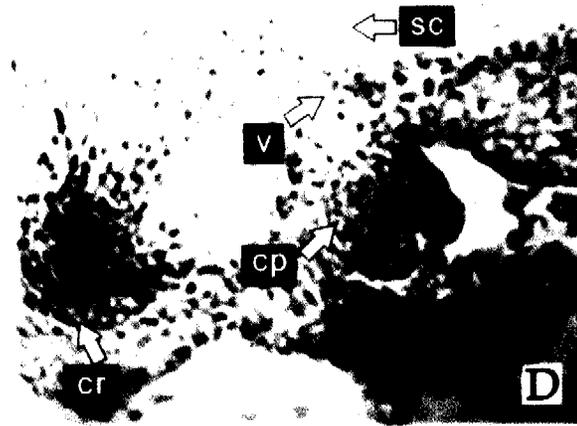
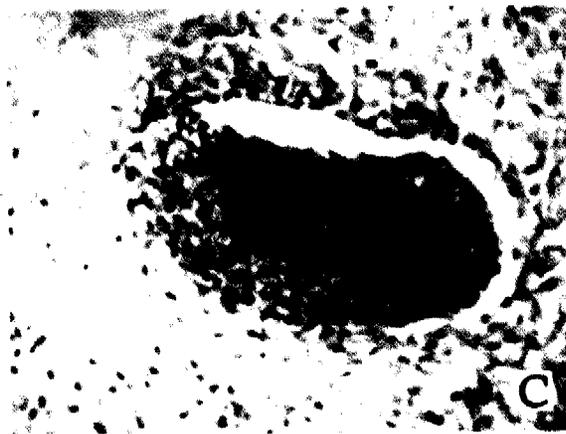
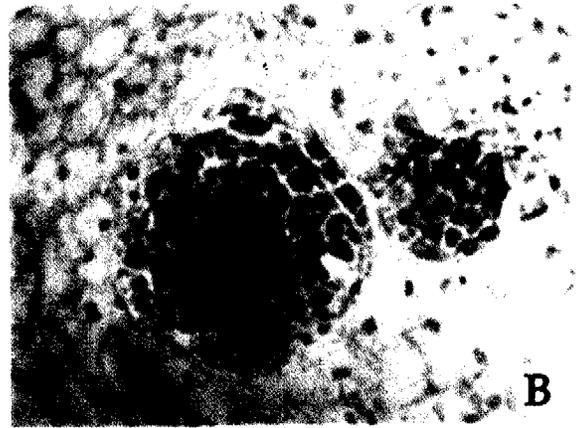
图版 I:

- A. 胚性愈伤组织纵切,可见球状突起(s);×100
 B. 愈伤组织内部形成两个球形胚;×100
 C. 球形胚与其周围的细胞产生明显的界线并逐步分离;×100
 D. 芽鞘形胚由胚芽鞘(cp)、胚根鞘(cr)、盾片(sc)以及连接在胚根鞘与盾片之间的维管束组成(v);×100
 E. 肉眼可见的体细胞胚胎;×40
 F, G. 未经继代培养(0代)的(F)和继代第23代体细胞胚的(G)再生植株。

Explanation of plate

Plate I:

- A. Longitudinal section of embryonic callus, showing the spherical tubercle (s); ×100
 B. Two globular embryos formed in the callus; ×100
 C. An obvious spacing line between globular embryo and surrounding cells; ×100;
 D. Coleoptile embryo consisting of coleoptile (cp), coleorrhiza (cr), scutellum (sc) and vascular bundles (v) connecting cr and sc; ×100;
 E. Macroscopic somatic embryos; ×40
 F, G. Regenerated plants from somatic embryos non-subcultured (F) and subcultured for 23 generations (G).



马镇荣等:图版 I

MA Zhen-rong et al.:Plate I