

香根草体细胞胚胎发生的细胞学特点与形成条件

马镇荣, 刘 卫, 王昌虎, 夏汉平, 凌定厚*

(中国科学院华南植物研究所, 广州 510650)

摘要: 香根草是一种优良的生态环境治理植物,但也存在着一些局限性。为了对香根草进行遗传改良,选育出性状更优、抗性更强的新品种,开展了香根草离体培养研究。离体培养采用了两种外植体,一是带腋芽的节,二是由器官发生方式所产生的无菌不定芽。基本培养基为 MS,根据不同的目的附加不同种类或配比的生长素与细胞分裂素。观察到香根草的外植体的离体发育途径,有器官发生和体细胞胚胎发生两种,依培养基中所含细胞分裂素或生长素的种类和用量不同而异。结果表明,香根草的这两种离体发育途径的植株再生能力均可以长期保持。细胞学的研究显示,香根草离体发育的启动可在外植体的表皮细胞或薄壁细胞中进行,这些细胞逐渐发育成为胚性细胞。胚性细胞分裂活跃,经二细胞、四细胞而发育成为多细胞的胚性细胞团。由显微观察可知,香根草的体细胞胚胎发生是单细胞起源的,成熟的体细胞胚具有单子叶植物典型的胚胎结构。在分化培养基的作用下,体细胞胚组织上所有的胚状体可以出芽而形成再生植株。所建立的香根草体细胞胚胎发生的植株再生体系,完全适用于遗传转化等生物工程方法对离体培养要求。此外,还观察到一些一般只有在双子叶植物才出现的鱼雷形体细胞胚,这是体细胞胚胎发生中的异常现象。认为这种异常胚是离体培养所引起的。

关键词: 香根草;体细胞胚胎发生;细胞学

Cytology observation and formation conditions of somatic embryogenesis in *Vetiveria zizanioides*

MA Zhen-Rong, LIU Wei, WANG Chang-Hu, XIA Han-Ping, LING Ding-Hou* (South China Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2003, 23(7): 1290~1296

Abstract: *Vetiveria zizanioides*, a perennial belonging to the grass family, is an excellent plant in the aspects of erosion control, polluted environment mitigation, and ecological restoration. However, the species itself has some shortcomings, such as too high height, and weak resistance to cold. Two kinds of explants were used in this experiment for *in vitro* culture of *V. zizanioides*. One was the node with axillary buds of the plant from the field and the other was the aseptic adventitious buds from organogenesis of

基金项目: 美国 Wallance 基因基金会资助项目; 广东省自然科学基金团队资助项目(003031); 中国科学院华南植物研究所所长基金资助项目

收稿日期: 2003-02-25; **修订日期:** 2003-04-16

作者简介: 马镇荣(1951~), 男, 广东省普宁市人, 助研, 主要从事遗传生态学研究, E-mail: mazr@scib.ac.cn

* **通讯作者** Author for correspondence, E-mail: lingdh@scib.ac.cn

Foundation item: The Wallance Genetic Foundation Through the Vetiver Netcoork, Guangdong NSF Group Project (No. 003031) and Director Foundation of South China Institute of Botany, CAS.

Received date: 2003-02-25; **Accepted date:** 2003-04-16

Biography: MA Zhen-Rong, Assistant professor, main research field: heredity ecology. E-mail: mazr@scib.ac.cn

cultured materials in test tube. We found that high quality embryogenic calli (E-calli) could be induced from small pieces of initiating adventitious buds from organogenesis because they possessed a lot of meristem using the basic MS medium supplemented with different kind or/and ratio of auxin (2,4-D, NAA, IBA and so on) or cytokinin (6BA, kinetin and so on), according to different culture purposes. The two kinds of *in vitro* developing ways in *V. zizanioides* were observed in this experiment. One was organogenesis and the other, somatic embryogenesis that was dependent upon the kind and dosage of auxin or cytokinin in the medium. When the medium contained 6BA 5 mg L⁻¹ and IBA 0.2 mg L⁻¹, the adventitious-buds clusters were directly induced from the explants without going through the callus stage. When the medium contained 2,4-D 2 mg L⁻¹ without or with very low concentration cytokinin, E-callus was formed from the explants and than the E-callus differentiated to a large numbers of plantlets in the regenerated medium. The results showed that the differentiated ability of the two ways of regeneration in *V. zizanioides* could be kept for a long duration. The results of cytology observation proved that the initiation action of *in vitro* development in *V. zizanioides* started in epidermal and parenchyma cells of the explants. With auxin/cytokinin in the medium, the explants became swollen at the beginning stage of inoculation. Under the microscope, various embryonic cells from single cell to multiple cell clusters could be clearly observed. Each embryogenic cell possessed a thicken cytoplasm, large and big darkly stained nucleolus. The division of the embryogenic cells was very active and in a same single scope under microscope, different stages of embryogenic cells, from single cell, two-four-to- multiple-cells could be observed. From these results, it could be concluded that embryonic callus in *V. zizanioides* was single cell origin. A mature embryo consisted of scutellum, coleoptile, and coleorhiza which were the typical structure of embryo in monocotyledon. In the regenerated medium, the embryos on the E-calli could germinate into abundant buds and regenerated plantlets could be obtained by the somatic embryogenesis in *V. zizanioides*. The regeneration system established in this experiment was appropriate transformation method for genetic-improvement of *V. zizanioides*. Besides, we observed that some abnormalities in torpedo embryos, which is a embryo-development stage in dicotyledon and without in monocotyledon, derived from *in vitro* culture.

Key words: *Vetiveria zizanioides*; somatic embryogenesis; cytology

文章编号:1000-0933(2003)07-1290-07 中图分类号:Q943.1 文献标识码:A

香根草(*Vetiveria zizanioides* (L.) Nash)这一禾本科多年生草本植物,已被广泛证明在水土保持、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能产生较理想的效果^[1~4]。但是,香根草目前尚存在着一定的局限性,比如,由于它们耐寒性不强,遗传上较单一,植株过高等等。

为了使这一优良草种在西部大开发中发挥作用,需要通过遗传改良,选育抗旱、耐寒品种。然而,香根草不能进行有性繁殖,对其进行遗传改良只能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。

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。体细胞胚胎发生的细胞学特点与再生条件在谷子^[5]、小麦^[6]、甘蔗^[7]、籼稻^[8]、玉米和高粱^[9]等禾本科植物上已有详细研究。在香根草方面,用其基部组织诱导愈伤组织及植株再生^[10]及用其嫩叶鞘和试管苗切段进行组织培养^[11]的实验,也已有报道。但在香根草体细胞胚胎发生及其细胞学观察方面尚未深入探讨。为了提高香根草遗传种质改良的效率,特别探讨了香根草体细胞胚胎发生¹的细胞学特点及条件。本文报道这一研究的初步结果。

1 材料与方法

1.1 外植体

供试材料取自华南植物园百草园实验基地。离体培养采用了两种外植体,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'+20%次氯酸钠 10'+氯化汞 20')后,把附着腋芽的小块节接种到培养基上。以无菌不定芽作外植体时,则在无菌条件下把不定芽从试管中取出并接种到新的培养基上。

1.2 培养基

以 MS^[12]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(如表 1);植株再生时附加 0.1 mg L⁻¹ KT, 2.0 mg L⁻¹ 6BA 和 2.0 mg L⁻¹ NAA。固体培养基含琼脂 8.0% (液体培养基除不加琼脂外,其他成分均相同),pH 值为 5.85。

1.3 细胞学观察

为观察体细胞胚的细胞结构,把体细胞胚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 μ m, Ehrlich 氏苏木精染色^[13]。封片后在显微镜下观察、照相。

1.4 植株的再分化、移栽和定植

把胚性愈伤转移到分化培养基上并予以 12 h/d 光照(1 200 lx),培养温度为 25 \pm 2 C。再生植株形成后,在生根培养基中约 2 周时间,根系发达即可盆栽。待株高长至 20cm 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 结果与分析

2.1 香根草离体培养时植株再生的途径

与其他单子叶植物离体培养时植株再生的方式一样,在香根草,也观察到器官发生和体细胞胚胎发生两种途径。

2.1.1 器官发生 以直接诱导不定芽并形成再生植株为目的,设计了仅含细胞分裂素,不含或仅含微量的生长素的培养基(表 1)。在接种后一周左右外植体即显著膨大,约半个月后,膨大的外植体表面形成许多突出物,以后逐渐发育成为芽点、不定芽。一个月之后,将不定芽分开转移至新的培养基(成分相同)上,不定芽可继续产生新的嫩芽而成为丛芽,因而可以用于快速繁殖。将处于繁殖中的不定芽转入 1/2MS 附加 0.2 mg L⁻¹ IBA 而不含细胞分裂素的培养基中,不定芽即诱导出根并长成小植株。

这种结果与许多研究的结果基本上是一致的。李耿光等^[14]证明,BA 和 2ip 均能明显地促进紫背天葵芽的分化。凌定厚等^[15]在水稻离体培养中发现,培养基中凡不含 2,4-D 而代之以 NAA 和激动素的则直接出芽。此外,Bajaj^[16]对 *Anagallis arvensis* 的组织培养,Vasil 等^[17]对 *Pennisetum* 的离体培养,也得到相似的结果。

在无菌条件下,把再生植株基部的幼嫩再生芽从试管中取出并接种到诱导培养基上,诱导出胚性愈伤组织以后,将它们转入不含生长素而含细胞分裂素的培养基中,即可形成大量的再生植株。

2.1.2 体细胞胚胎发生 在本实验的条件下,观察到香根草的体细胞胚胎发生可直接从外植体产生,也可从非胚性愈伤组织经改变培养基成分之后产生。前一种情况,外植体启动的细胞由单一的胚性细胞像受精卵那样不断分裂,经双细胞、四细胞、多细胞而发育成胚性愈伤组织。在本实验中观察到香根草体细胞胚胎发生的过程具有如下特点。

表 1 MS 诱导培养基中几种生长调节剂的配比

Table 1 Confecting dosage for some growth regulators in inducement medium MS

生长调节剂 Growth regulators	在各种培养基中浓度 Confecting dosage (mg L ⁻¹) in various medium						
	1	2	3	4	5	6	7
2,4-D	0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
6BA	5.0	0	0	0	0	0.5	0.5
KT	0	0	0.2	0.5	1.0	0.5	0
IBA	0.2	0	0	0	0	0	0

(1) 香根草体细胞胚的形成的过程 香根草的外植体(腋芽)在接种后开始膨大,表皮细胞开始启动,

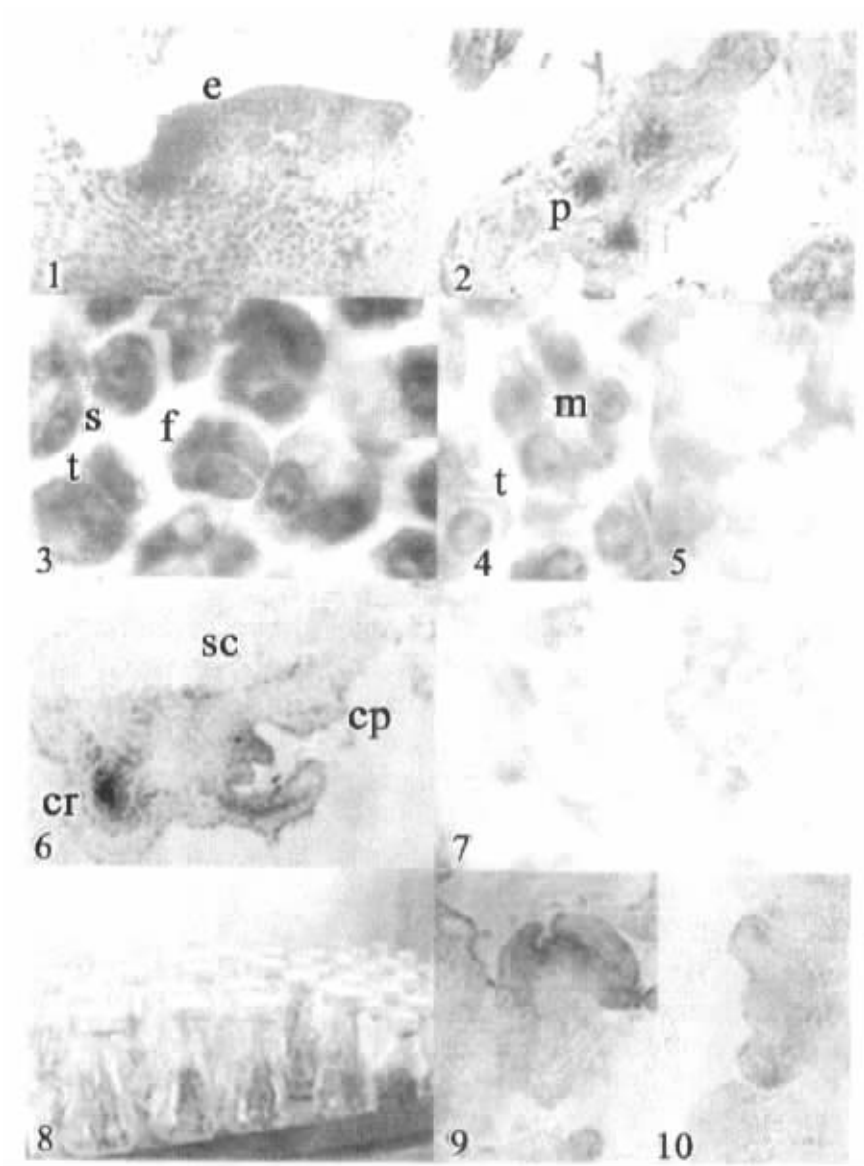


图 1 香根草体细胞胚的形成及再生植株

Fig. 1 Formation of somatic embryos and regeneration plants in *V. zizanioides*

1. 接种两周后开始启动的外植体表皮细胞(e), ×100 Epidermal cell (e) of the explant began to initiate division after two weeks of inoculation, ×100; 2. 开始启动的外植体的维管束及其周围的薄壁细胞(p), ×100 Vascular bundle and parenchyma cell (p) began to division after two weeks of inoculation, ×100; 3. 处于各时期的体细胞胚: 单细胞(s), 双细胞(t)及四细胞(f)原胚; ×1 000 Somatic embryo with proembryo at different stage: single cell (s), two cells (t), four cells (f), ×1 000; 4. 多细胞原胚(m), ×1 000 Somatic embryo with multiple cells proembryo (m), ×1 000; 5. 胚性愈伤组织, ×30 Visible embryonic callus, ×30; 6. 时期单一的体细胞胚, 由胚根(cr)、胚芽(cp)及盾片(sc)组成, 在胚根与胚芽之间有维管束相连, ×100 Single somatic embryos consisted of coleorhiza (cr), coleoptile (cp) and scutellum (sc), vascular bundles joined between the coleorhiza and coleoptile, ×100; 7. 正处于分化时期的胚性愈伤, 每个体细胞胚正在萌发, ×100 Embryonic callus is in the differentiation period, each somatic embryo is budding, ×100; 8. 已分化成苗的大批再生植株 A large number of regeneration plants from somatic embryogenesis; 9~10. 畸形的体细胞胚具有双子叶植物鱼雷形的原胚形态, ×100 Unusual somatic embryo with torpedo proembryo which only exists in dicotyledoneae ×100

这时,部分表皮细胞的细胞质变浓,细胞分裂加速,在显微镜下可观察到这部分细胞着色很深(图 1-1)。此外也观察到外植体内部的薄壁细胞或维管束部分的薄壁细胞分裂加速、着色加深的图象(图 1-2)。这表明香根草离体发育的启动既有表皮细胞又有薄壁细胞的参与。在分裂旺盛的区域里,可以观察到典型结构的胚性细胞。与其他植物一样,香根草的胚性细胞具有很大的细胞核,着色最深的核仁,细胞质浓,细胞间隙大。在一个视野中可以同时观察到单细胞(图 1-3;S)、双细胞(图 1-3,图 1-4;t)、四细胞(图 1-3;f)及多细胞(图 1-4;m)原胚。与水稻的胚性细胞不同的是,香根草的胚性细胞形态上不规则且有棱角。在同一视野可观察到从单细胞到多细胞的一系列原胚的事实表明,香根草胚性细胞的分裂活动是很活跃的。

(2) 香根草体细胞胚的特点 原胚的细胞经过不断分裂而发育成肉眼可见的胚性愈伤组织(图 1~5)。与其他禾本科植物一样,香根草的胚性细胞为白色颗粒状的不定形结构,质地颇为致密,每一个肉眼所见到的愈伤组织上的颗粒即为一个体细胞胚。体细胞胚具有单子叶植物典型的胚胎结构,在纵切面结构(图 1~6)可以观察到每个胚状体由胚芽(cp)、胚根(cr)及盾片(sc)组成,在胚根与盾片之间有明显的输导组织相连接。从图 1-6 可以清楚地观察到一条着色很深的维管束连接在胚根与盾片之间。胚芽、胚根、盾片及其间的完整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。本研究中,就观察到香根草完整的胚状体结构。在自然界,虽然香根草不能进行有性繁殖,但从离体培养中成功地诱导出它们的体细胞胚。

胚性愈伤组织的植株再生能力是很强的,每一个胚状体均可发育成为独立的小植株。在分化培养基上(见下节)胚状体开始萌发。分化初期,可观察到一个胚性愈伤上布满了绿点(图 1-7),实际上每个绿点就是一个体细胞萌发的胚芽。绿点逐渐发育成不定芽并诱导出根即成为小植株(图 1-8)。

从上述结果可以得出如下几点:(1)香根草的体细胞胚是单细胞起源的;(2)香根草的体细胞胚具有单子叶植物典型的胚胎结构,植株再生能力很强;(3)香根草的体细胞胚的植株再生能力在继代条件下可以长期保持。本实验所建立的香根草体细胞胚胎发生的体系为香根草遗传转化奠定了良好的基础。

(3) 异常胚状体 此外,还观察到一些鱼雷形体细胞胚(图 1-9,图 1-10),这是体细胞胚胎发生中的异常现象。众所周知,鱼雷形胚是双子叶植物所特有的一个胚胎发育时期。单子叶植物的胚胎发育不具有这一时期。但在香根草的体细胞胚胎发生的过程中观察到鱼雷形时期的幼胚,认为这种异常胚是离体培养所引起的。

2.2 愈伤组织的诱导条件

如表 1,在所设计的 7 种不同生长调节剂配比的培养基中,除了仅含细胞分裂素,不含或仅含微量的生长素的(表 1)外,其余的均能程度不同地诱导出愈伤组织。其中,腋芽外植体在含有 2.0mg L^{-1} 2,4-D 和 0.5mg L^{-1} KT 的培养基(表 1,表 2)上暗培养 10d 左右,即开始从切口处长出愈伤组织,在两个品种的培养试验中表现都是一致的,愈伤诱导率高达 83.3% 和 80.0%。而在其他生长调节剂配比的培养基上,愈伤诱导率则比较低,最低的在一个品种仅有 21.4%,另一个品种为 0(表 1,表 2)。这种愈伤组织不具备上述胚性结构,称为非胚性愈伤组织。它们呈淡黄色,结构上较为松散。

实验表明,对于以香根草外植体腋芽诱导愈伤组织而言,含有 2.0mg L^{-1} 2,4-D 和 0.5mg L^{-1} KT 的 MS 培养基是最合适的;两者的配比为 $2.0\text{mg L}^{-1} : 0.2\text{mg L}^{-1}$ 的培养基次之;含有相同量的 2,4-D 加上 0.5mg L^{-1} 6BA 和 0.5mg L^{-1} KT 的培养基再次之;仅含 2,4-D 的培养基,愈伤诱导率低甚至不出愈伤。按本实验看,6BA 对于体细胞

表 2 不同生长素和细胞分裂素对香根草诱导愈伤组织的影响*

Table 2 Effect of different confecting proportion of auxin and cytokinin on inducing calli in vetiver*

培养基 Media	香根草 Vetiver# 11		香根草 Vetiver# 12	
	愈伤组织块数 Number of calli (piece)	愈伤组织诱导频率 Frequency of calli induction (%)	愈伤组织块数 Number of calli (piece)	愈伤组织诱导频率 Frequency of calli induction (%)
2	40	61.5	20	50.0
3	35	70.0	30	75.0
4	50	83.3	48	80.0
5	26	57.8	25	62.5
6	14	28.0	5	7.1
7	15	21.4	0	0

* 培养基序号同表 1 Codes of media were the same as table 1; 每种培养基的外植体数量为 40~60, 重复 2 次 Values are means from two replications of each experiment using 40 to 60 explants per medium

胚的诱导不起作用,至少可以说其作用是次要的。

2.3 体细胞胚的诱导条件

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。试验结果见表 3。

表 3 不同生长素和细胞分裂素对比对香根草诱导体细胞胚的影响

Table 3 Effect of different confecting proportion of auxin and cytokinin on inducing somatic embryos in vetiver

培养物*		培养基	2,4-D	6BA	体细胞胚状况 Status of somatic embryos
种类	数量(个)	代号	(mgL ⁻¹)	(mgL ⁻¹)	
Kinds	Amount (p)	Code of medium			
C	90	8	0	0.5	未见体细胞胚 No E-callus
B	72	8	0	0.5	只长芽、叶,不长愈伤 Developed buds and leaves only
C	93	9	0	1.0	未见体细胞胚 No E-callus
B	64	9	0	1.0	只长芽、叶,不长愈伤 Developed buds and leaves only
C	90	10	0.5	0	体细胞胚发育很好,仅 3.3% 无体细胞胚 E-callus developed very well, only 3.3% pieces of calli were no E-callus
B	70	10	0.5	0	仅 10% 不定芽增大,但非体细胞胚 Only 10% buds developed calli, but all were not E-callus
C	97	11	1.0	0.5	体细胞胚发育较好, 14.1% 无体细胞胚 E-callus developed well, 14.1% pieces of calli were without E-callus
B	77	11	1.0	0.5	21.5% 无菌不定芽无体细胞胚,其余多数体细胞胚质好 21.5% aseptic adventitious buds no E-callus, majority of the others developed very good E-callus
C	90	12	2.0	1.0	体细胞胚发育较好, 9.9% 无体细胞胚 E-callus developed well, only 9.9% pieces of calli were no E-callus
B	78	12	2.0	1.0	61.5% 芽无体细胞胚 61.5% buds no E-callus
C	92	13	4.0	2.0	体细胞胚发育较好, 15.4% 无体细胞胚 E-callus developed well, 5.4% pieces of calli were no E-callus
B	90	13	4.0	2.0	62.2% 不定芽无体细胞胚 62.2% buds no E-callus

* C 愈伤组织 callus; B 无菌不定芽 aseptic adventitious buds; p = Number of pieces

从表 3 看到,在培养基不附加 2,4-D 的条件下,无论 6BA 的含量是 0.5 还是 1.0mg L⁻¹,都没有体细胞胚产生;而在含有 2,4-D 的条件下,无论是否含有 6BA 均有体细胞胚产生,且体细胞胚发生的频率以不含 6BA 的为最高(96.7%);含有少量 6BA 时,虽体细胞胚的诱导率有所降低,但在这种培养基上形成的体细胞胚具有较高的再生能力(资料未列出);而当 2,4-D 的含量达到 4.0mg L⁻¹时,62.2% 无菌不定芽不能诱导出体细胞胚,无菌不定芽的最适配比是 1.0(2,4-D):0.5(6BA),诱导率为 78.5%,多数体细胞胚质量很好。

综合香根草在离体培养时对培养基中生长素(2,4-D)及细胞分裂素(6BA)的反应,可以看出当培养基中只含细胞分裂素而不含生长素时,外植体(腋芽)经由器官发生途径(不定芽)形成再生植株;相反,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(腋芽或不定芽等)经由体细胞胚胎发生途径形成再生植株。这一结果与凌定厚等^[18]对籼稻及 Vasil 等^[5]对 *Pennisetum* 体细胞胚胎发生研究的结果是一致

表 4 继代培养时间对香根草 Randy 胚性愈伤再生频率的影响*

Table 4 Effect of subculture duration on regeneration frequency of embryogenic calli in vetiver Randy

继代培养时间(月)	胚性愈伤块数	再生小植株(丛)	再生频率
Subculture duration (months)	Num. of E-calli (piece)	Regenerated plantlets (cluster)	Regeneration frequency (%)
18	400	368	92.00
20	750	695	92.67
22	350	300	85.71
24	750	612	81.60

* (1) 资料来自最近半年每两个月一次的统计 Data were come from count every two months in recent half year; (2) 同一块胚性愈伤分化出的丛生苗按 1 丛计算 Regenerated plants from same callus was calculated as 1 cluster

的。这表明,2,4-D 确实为禾本科植物离体培养时诱导体细胞胚胎发生的重要因素。

2.4 体细胞胚的植株再生并长期保持高的再生能力

将胚性愈伤转入分化培养基时,两周时间即呈绿色并逐渐萌发出芽(图 1-7),继而逐渐发育成为完整的小植株。体细胞胚在继代条件下,胚性结构及植株再生能力可以长期保持。表 4 显示连续继代两年的胚性愈伤组织仍然具有很高的再生能力。

根据对禾本科植物离体培养的经验及有关文献报道,一般认为胚状体为单细胞起源,所以体细胞胚胎发生的方式有利于用作突变体离体筛选、遗传分析、原生质体培养等方面的可靠来源^[19],而且这种方式具有长期保持再分化能力的潜力^[20]。香根草体细胞胚胎发生的植株再生途径也已充分证实了这一点,因而完全可以满足遗传转化方面的要求。

References:

- [1] National Research Council. *Vetiver Grass: A Thin Green Line Against Erosion*. Washington D C: National Academy Press, 1993.
- [2] Summerfelt S T, Adler P R, Gleen D M, et al. Aquaculture sludge removal and stabilization within created wetlands. *Aquacultural Engineering*, 1999, **19**: 81~92.
- [3] Chen K, Hu G Q, Rao H M, et al. Ecological effects of planting vetiver grass in citrus groves on sloping red soil fields. *Acta Ecologica Sinica*, 1994, **14**(3): 249~254.
- [4] Xia H P, Shu W S. Resistance to and uptake of heavy metals by *Vetiveria zizanioides* and *Paspalum notatum* from lead/zinc mine tailings. *Acta Ecologica Sinica*, 2001, **21**: 1121~1129.
- [5] Vasil V and Vasil I K. Characterization of an embryogenic cell suspension culture derived from cultured inflorescences of *Pennisetum americanum*. *Amer. J. Bot.*, 1982, **69**:1441~1449.
- [6] Ozias-Akins P and Vasil I K. Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescences of *Triticum aestivum* L. wheat: Evidence for somatic embryogenesis. *Protoplasma*, 1982, **110**: 95~105.
- [7] Ahloowalia B S and Maretzki A. Plant regeneration via somatic embryogenesis in sugarcane. *Plant Cell Reports*, 1983, **2**:21~25.
- [8] Ling D H, Chen W Y, Chen M F, et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration in an interspecific hybrid of *Oryza*. *Plant Cell Reports*, 1983, **2**:169~171.
- [9] Vasil V, Vasil I K and Lu C Y. Somatic embryogenesis long term cultures of *Zea mays* L. (Gramineae) *Amer. J. Bot.*, 1984, **71**:158~161.
- [10] Marco M, Marisa G, Silvano S, et al. Callus induction and plant regeneration in *Vetiveria zizanioides*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1993, **35**:267~271.
- [11] Ma G H, Xia H P, Xian Y L. Somatic embryogenesis and shoot formation from explants of *Vetiveria zizanioides*. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 2000, **8**(1): 1~10.
- [12] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant*, 1962, **15**:473~497.
- [13] Zheng G C. *Biological Microscopic Techniques*. Beijing: People's education publishing house, 1978. 17~112.
- [14] Li G G, Zhang L Y, Zhu B Q, et al. Callus induction and organ differentiation in the tissue culture of begonia *fimbripetala* hance. *Acta Botanica Sinica*, 1983, **25**(3): 238~244.
- [15] Ling D H, Chen W Y, Chen M F, et al. Study on spikelet budding directly from immature panicle culture in rice. *Acta Botanica Sinica*, 1985, **27**(4): 435~438.
- [16] Bajaj Y P S and Mader M. Growth and morphogenesis in tissue culture of *Anagallis arvensis*. *Physiol. Plant*, 1974, **32**:43~48.
- [17] Vasil V and Vasil I K. Somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension cultures of pearl millet (*Pennisetum americanum*). *Ann. Bot.*, 1981, **47**:669~678.
- [18] Ling D H, Yosida S. The study of some factors affecting somatic embryogenesis in IR lines of rice. *Acta Botanica Sinica*, 1987, **29**(1):1~8.
- [19] Ling D H, Brar D S, Zapata F J. Cytology and histology in somatic embryogenesis of indica rice. *Acta Botanica Sinica*, 1988, **30**(5): 485~489.
- [20] Vasil V, Vasil I K. Toward the development of a sing cell system for grasses. In: IGAS and IIRI eds: *Cell and Tissue Culture Techniques for Cereal Crop Improvement*. Beijing, Sci. Press, 1983. 131~144.

参考文献:

- [3] 陈凯, 胡国谦, 饶辉茂, 等. 红壤坡地柑桔园栽植香根草的生态效应. *生态学报*, 1994, **14**(3): 249~254.
- [4] 夏汉平, 束文圣. 香根草和百喜草对铅锌尾矿重金属的抗性与吸收差异研究. *生态学报*, 2001, **21**: 1121~1129.
- [11] 马国华, 夏汉平, 姜蕴兰. 香根草不同外植体诱导体细胞胚胎发生和器官发生. *热带亚热带植物学报*, 2000, **8**(1): 55~59.
- [13] 郑国. *生物显微技术*. 北京:人民教育出版社, 1978. 17~112.
- [14] 李耿光, 张兰英, 朱饱卿, 等. 紫背天葵愈伤组织的诱导和器官分化. *植物学报*, 1983, **25**(3): 238~244.
- [15] 凌定厚, 陈琬瑛, 陈梅芳, 等. 水稻幼穗培养中颖花直接出芽的研究. *遗传学报*, 1985, **27**(4): 435~438.
- [18] 凌定厚, 束文圣. 影响籼稻体细胞胚胎发生几个因素的研究. *植物学报*, 1987, **29**(1):1~8.
- [19] 凌定厚, Brar D S, Zapata F J. 籼稻体细胞胚胎发生的组织学及细胞学研究. *植物学报*, 1988, **30**(5):485~489.