

# 香根草组织培养技术的研究

杨冰冰, 夏汉平, 马镇荣\*

(中国科学院华南植物园生态研究所, 广东 广州 510650)

**摘要:** 香根草常规的无性繁殖方式难以满足运用生物技术筛选香根草抗性种质对种苗的需求, 更难以满足大规模的香根草生态工程对种苗的需求。因此, 创建香根草的组织培养技术是很有必要的。以香根草的腋芽为外植体进行离体培养, 以 MS 为基本培养基, 对胚性愈伤组织的诱导和植株再生体系的建立进行了优化。结果表明, 适宜的诱导愈伤培养基为 MS+2.0 mg/L 生长素(2,4-D)+1.0 mg/L 细胞分裂素(6-BA), 愈伤组织诱导率最高可达 96.7%; 适宜的分化培养基为 MS+1.0 mg/L 6-BA; 适宜的生根培养基为 1/2 MS+0.1 mg/L 吲哚丁酸(IBA)+0.1 mg/L 多效唑(PP333)。不同品种在相同培养条件下的愈伤诱导率存在较大差异。香根草的胚性愈伤组织具有单子叶植物典型的胚胎结构, 其植株再生能力在继代条件下可以长期保持, 继代 18 次的愈伤组织植株再生能力仍高达 92.0%, 即使继代 24 次后仍可达 89.6%。香根草高效再生系统的建立为香根草开展基因工程及遗传转化方面的研究奠定了基础, 也为大规模繁殖香根草种苗提供了新的技术保障。

**关键词:** 香根草; 体细胞胚; 胚性愈伤组织; 继代培养; 植株再生

**中图分类号:** S543.035.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-5759(2007)04-0093-07

香根草(*Vetiveria zizanioides*)又名岩兰草, 是一种产于热带亚热带地区的多年生禾本科植物, 也是迄今为止所发现的最为理想的水土保持植物之一。自 20 世纪 80 年代中期以来, 该植物在世界银行的资助下开始在印度等国推广应用, 仅 20 年左右的时间, 就在全球的热带亚热带 100 多个国家和地区推广应用开来。香根草之所以受到如此重视, 主要是因为它具有纵深发达的根系系统, 堪称是“世界上具有最长根系的草本植物”, 以及对环境有较强的适应性, 对酸、碱、涝、贫瘠、重金属、有机物等都表现出了较强的抗性<sup>[1,2]</sup>。因此, “香根草生态工程”被认为是人类战胜水土流失和净化污染环境的新希望<sup>[3]</sup>。由于我国日益突出的生态环境问题及人们对香根草治理环境的认可, 近几年来, 国内对香根草种苗的需求日益增长。然而, 香根草不产生种子, 通常只能靠无性繁殖, 繁殖速度相对较慢, 这种传统的分蘖繁殖方式已不能满足目前颇受关注的香根草生态工程对种苗的需求。同时, 为了能进一步开展香根草的生物技术研究, 如筛选矮化、抗寒、抗盐、抗重金属等的突变体, 使这一优良物种得到更大范围的推广与应用, 通过一系列试验观测, 总结出一套高效稳定的香根草组织培养和再生繁殖技术, 以期满足人们对香根草优质种苗的市场需求及科学研究筛选种质的需要。

有关香根草组织培养技术的研究从 20 世纪 90 年代开始。在国外, Mucciarelli 等<sup>[4]</sup>首次用香根草的基部组织成功地诱导出了愈伤组织及再生植株; Leupin 等<sup>[5]</sup>用茎尖和嫩叶苗切段的方法也诱导出了愈伤组织。在国内, 马国华等<sup>[6]</sup>、马镇荣等<sup>[7]</sup>、韩露等<sup>[8]</sup>以及郑贵朝等<sup>[9]</sup>分别用嫩叶鞘、茎节和茎段诱导出了愈伤组织及再生植株, 但他们的愈伤组织诱导率都相对较低, 为 60.5%~71.9%。本研究是在前人研究的基础上, 进一步优化了再生体系建立的条件, 首次利用其腋芽作为外植体, 在培养基中附加 2.0 mg/L 2,4-D 和 1.0 mg/L 6-BA, 成功地诱导出了香根草的胚性愈伤组织, 诱导率最高可达 96.7%, 建立了高效的香根草组织培养再生系统, 为利用生物技术开展香根草遗传基因的转化及抗性种质的筛选奠定了良好基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

供试材料来源于中国科学院华南植物园百草园实验基地, 包括 Kandy, Karnataka, Malaysia, Sunshine 和

收稿日期: 2006-01-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(30370233)资助。

作者简介: 杨冰冰(1971-), 女, 河南信阳人, 在读博士。E-mail: yangbb@scbg.ac.cn

\* 通讯作者。E-mail: mazr@scbg.ac.cn

Zomba 5 个香根草品种,它们分别来自斯里兰卡、印度、马来西亚、美国和马拉维。全部品种均于 1999 年引入,随后一直种植在华南植物园的百草园内。田间观测显示,Kandy 的分蘖速率最高,Karnataka 次之,而 Zomba 最低;此外,Karnataka 不抽穗,因而株高最矮,比其他品种矮 50~80 cm<sup>[10]</sup>。

### 1.2 培养基及培养条件

以 MS (murashige and skoog)培养基为基本培养基,诱导愈伤和继代培养时附加 2.0 mg/L 生长素(2,4-D)和 1.0 mg/L 细胞分裂素(6-BA);分化培养时附加 1.0 mg/L 6-BA;诱导生根时为 1/2 MS 附加 0.1 mg/L 吲哚丁酸(IBA)和 0.1 mg/L 多效唑(PP<sub>333</sub>)。固体培养基含 8.5 g/L 琼脂,30 g/L 蔗糖,pH 值为 5.85。培养温度为 25℃,诱导愈伤和继代培养时为暗培养,分化和生根诱导时,给予 12 h/d 光照(1 200 lx)。

### 1.3 愈伤组织的诱导、分化和移植

当香根草拔节、腋芽发育完好后,适当剪取其茎秆,剥去叶鞘,截取带腋芽的节,先用 70%乙醇表面消毒 2 min,再用 20%次氯酸钠消毒 10 min,然后用 0.1% HgCl<sub>2</sub> 消毒 20 min,之后在超净工作台上小心剥离腋芽(注意一定要保留基部白色部分),并轻轻划一伤口(以刺激产生愈伤组织),再将其接种到诱导培养基上,在 25℃恒温下暗培养,每 2 d 观察记录一次,及时处理被污染的材料,把没被污染的材料及时转移到新鲜培养基上。大约 7 d 后就陆续有愈伤组织产生,15~20 d 后,将一部分生长良好的胚性愈伤组织转移到继代培养基中 25℃继代培养,将另一部分愈伤组织转移到分化培养基中培养产生丛芽,然后再将丛芽转移到生根培养基中培养 10~15 d,逐渐长出根系。最后将试管苗移栽入盆,生长一段时间后,在大田里定植。从愈伤组织的诱导到试管苗的移植大约需要 4 个月。

### 1.4 胚性愈伤组织的诱导

以 MS 培养基为基本培养基,设计 6 种不同 2,4-D 和 6-BA 浓度配比的诱导培养基,分别为 0.5 mg/L 6-BA, 1.0 mg/L 6-BA,0.5 mg/L 2,4-D,1.0 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L 6-BA,2.0 mg/L 2,4-D+1.0 mg/L 6-BA,4.0 mg/L 2,4-D+2.0 mg/L 6-BA,对 2 个香根草品种 Karnataka 和 Zomba 的腋芽进行诱导,以统计诱导胚性愈伤的效果。

### 1.5 不同品种愈伤组织诱导率的观察

在相同培养条件下,选取 Kandy, Karnataka, Malaysia, Sunshine 和 Zomba 5 个品种,分别接种在含 2,4-D 2.0 mg/L 和 6-BA 1.0 mg/L 的 MS 诱导培养基上,暗培养 15~20 d 后进行观察。

## 2 结果与分析

### 2.1 愈伤组织的诱导

**2.1.1 愈伤组织的诱导条件** 在培养基中添加不同的植物激素,通过外源激素的调节平衡愈伤组织的内源激素比例,在一定程度上可以促进愈伤组织分化。培养基不附加 2,4-D 时,2 个品种的腋芽均没有愈伤组织产生(表 1);而在附加 2,4-D 的条件下,无论是否含有 6-BA,均可诱导出愈伤组织,且 2 个品种愈伤组织的诱导率在 2.0 mg/L 2,4-D+1.0 mg/L 6-BA 时;分别为其他浓度配比的 1.13~2.48 倍,差异极显著( $P<0.01$ )。当 2,4-D 的含量达到 4.0 mg/L 时,2 个品种愈伤组织的诱导率反而都有所下降,分别为 54.3%和 37.8%。可见,2,4-D 在愈伤组织的诱导中确实起着关键的作用,但高浓度的 2,4-D 对愈伤组织的诱导反而起抑制作用,而 6-BA 对愈伤组织的诱导起次要作用。

**2.1.2 不同品种的愈伤组织诱导率的差异** 品种 Zomba 的愈伤组织诱导率最高(表 2),达到了 96.7%,是其他品种的 1.35~3.53 倍;其次是 Karnataka,是其他品种的 1.29~3.10 倍,达到 93.1%,这 2 个品种显著高于其他品种( $P<0.05$ );最低为 Malaysia,不足 30.0%。可是尽管愈伤诱导率各不相同,但所有品种的愈伤组织都能产生体细胞胚。胚性愈伤组织诱导率的高低与腋芽的发育时期也有一定的关系,这对于利用特定发育时期的不同品种开展试验提供了依据。

### 2.2 继代培养与植株再生能力

将生长良好的胚性愈伤组织转移到继代培养基上,在暗室里 25℃继续培养。图 1A 为继代 24 次的愈伤组织,其中有相当一部分仍能形成胚性愈伤组织(图 1B),保持着很高的再生能力。继代培养基仍然为 MS+2.0 mg/L 2,4-D+1.0 mg/L 6-BA。香根草的胚性细胞为乳白色颗粒状的不定形结构,质地颇为致密,具有单子叶

表 1 不同比例的生长素(2,4-D)和细胞分裂素(6-BA)配比对香根草愈伤组织诱导率的影响

Table 1 Effects of different confecting proportions of 2,4-D and 6-BA on inducing calli in *V. zizanioides*

诱导培养基 Induction medium 2,4-D+6-BA (mg/L)	香根草 Karnataka		香根草 Zomba	
	愈伤组织数 Number of calli	愈伤组织诱导频率 Frequency of induction (%)	愈伤组织数 Number of calli	愈伤组织诱导频率 Frequency of induction (%)
0+0.5	0 C	0 D	0 D	0 D
0+1.0	0 C	0 D	0 D	0 D
0.5+0	41.9±4.6 B	68.0±2.5 C	40.7±2.1 B	67.1±2.6 B
1.0+0.5	51.6±4.2 A	85.6±7.1 B	47.9±1.5 B	77.9±3.4 B
2.0+1.0	58.2±3.7 A	96.7±6.4 A	56.9±0.8 A	93.6±2.8 A
4.0+2.0	33.3±2.8 B	54.3±2.3 C	23.8±3.2 C	37.8±2.8 C

注:同列中,标有不同大写字母者差异极显著( $P<0.01$ ),标有相同字母者差异不显著。

Note: Values followed by different letters within lines differ significantly ( $P<0.01$ ), same letter means no significant difference.

表 2 接种 30 d 后香根草不同品种的愈伤组织诱导率

Table 2 Callus induction frequency of different *V. zizanioides* cultivars 30 d after inoculation

品种 Cultivar	外植体数 Number of explants	愈伤组织数 Number of calli	愈伤组织诱导率 Induction frequency (%)
Kandy	117.6±6.7 c	84.8±1.9 c	71.7±0.7 b
Karnataka	188.4±5.9 b	175.7±5.6 b	93.1±1.1 a
Malaysia	102.7±5.9 c	28.5±1.5 d	27.4±0.2 c
Sunshine	100.9±4.8 c	69.3±2.6 c	69.0±0.3 b
Zomba	237.1±8.2 a	229.1±7.4 a	96.7±2.1 a

注:同列中,含有不同字母者差异显著( $P<0.05$ ),标有相同字母者差异不显著。

Note: Values followed by different letters within lines differ significantly ( $P<0.05$ ), same letter means no significant difference.

植物典型的胚胎结构<sup>[7]</sup>。胚性愈伤组织具有很强的植株再生能力,每个胚状体均可发育成独立的小植株,并且在继代条件下,其再生能力可长期保持,继代 18 次的愈伤组织其植株再生能力仍高达 92.0%,即使继代 24 次以后,仍可达 89.6%(表 3),方差分析表明各继代次数间的再生频率无显著差异( $P>0.05$ )。

### 2.3 分化培养

将愈伤组织或继代的愈伤组织转移到含 1.0 mg/L 6-BA 的 MS 分化培养基上 25℃ 培养,给予 12 h/d 的光照(1 200 lx)。培养 20 d 后,愈伤组织即分化出大量的丛芽(图 2A),出芽率达 90% 以上。挑出其中一块愈伤放大观察,可看出上面布满了绿点和不定芽(图 2B),这些都有可能分化成幼苗。

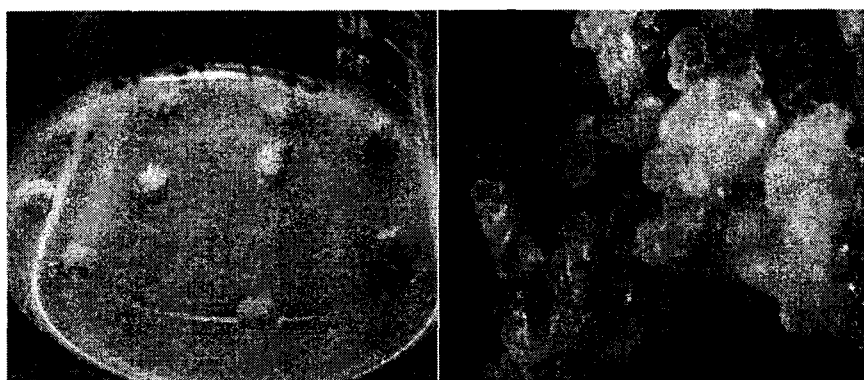


图 1 胚性愈伤组织在继代培养基上的继代培养

Fig. 1 Continuing culture of embryonic calli of *V. zizanioides* on subculture medium

A, 继代 24 次的愈伤组织 Calli of subculture 24 generations; B, 胚性愈伤组织 Embryonic calli of *V. zizanioides*

表3 继代次数对愈伤组织再生能力的影响

Table 3 Effects of subculture duration on regeneration frequency of embryogenic calli

继代次数 Subculture times	胚性愈伤数 Number of E-calli	再生植株数 Regenerated plantlets	再生频率 Regeneration frequency (%)
18	402.4±15.7 b	368.7±11.5 b	92.0±3.8 a
20	750.6±18.3 a	695.3±14.1 a	90.7±4.5 a
22	350.2±10.9 b	304.2±10.3 b	89.7±2.9 a
24	753.1±12.5 a	612.9±17.2 a	89.6±1.8 a

注:同列中,含有不同字母者差异显著( $P < 0.05$ ),标有相同字母者差异不显著。

Note: Values followed by different letters within lines differ significantly ( $P < 0.05$ ), same letter means no significant difference.



图2 愈伤组织的分化

Fig. 2 Differentiation of calli

A: 在分化培养基上生长 20 d 后的愈伤组织 Embryonic calli inoculated on differentiation medium for 20 d; B: 正在分化的愈伤组织上面布满绿点和不定芽 Every differentiation embryonic callus was besprinkled with green dots and adventitious buds

#### 2.4 生根培养

将发育良好的丛芽转移到含 0.1 mg/L IBA 和 0.1 mg/L PP<sub>333</sub> 的 1/2 MS 生根培养基上 25℃ 培养, 给予 12 h/d 的光照(1 200 lx), 培养 10~15 d 后即逐渐长出不定根, 生根率几乎为 100%, 株高达 10~15 cm(图 3A); 30 d 左右后丛芽发育成株高 20 cm 以上、根系发达、可移栽到大田的幼苗(图 3B)。

#### 2.5 移植栽培

由于组培苗长期在营养丰富的无菌条件下生长, 抗逆性较差, 根系活力低, 直接移入土壤中栽培会影响其成活率。因此先将试管苗的瓶口打开, 炼苗 2~3 d, 洗去根部琼脂后, 移植到配制好的(最好消过毒的)培养箱中培养, 保持湿润和清除杂草。试管苗在培养箱中的成活率几乎可达 100%。1 个月后, 再定植到大田里, 按 20 cm×30 cm 左右的株行距进行定植即可。

### 3 讨论

综合香根草在离体培养时对培养基中 2,4-D 和 6-BA 的反应, 可以看出 2,4-D 确实是香根草离体培养时诱导愈伤组织发生的重要因素。Mucciarelli 等<sup>[4]</sup>对香根草的研究也表明, 2,4-D 的浓度对愈伤组织的诱导有很明显的影响。当培养基中含有 2,4-D 而不论是否含有 6-BA 时, 香根草的外植体都可以诱导出愈伤组织(表 1)。这一结果与其他单子叶植物体细胞胚胎发生研究的结果基本一致, 例如甘蔗 (*Saccharum officinarum*)<sup>[11]</sup>、玉米 (*Zea mays*)<sup>[12]</sup>、狗牙根 (*Cynodon dactylon*)<sup>[13]</sup>、日本结缕草 (*Zoysia japonica*)<sup>[14]</sup> 和羊草 (*Leymus chinensis*)<sup>[15]</sup> 等等。

就不同品种的香根草而言, 其胚性愈伤组织的诱导率明显不同(表 2)。这与水稻 (*Oryza sativa*)<sup>[16]</sup> 等植物在诱导愈伤过程中的现象是一致的, 都是不同基因型对离体培养的反应。但试验已经显示, 胚性愈伤组织诱导频率在香根草不同品种之间有的不具差异显著性, 有的则具差异显著性<sup>[17]</sup>。试验过程还发现, 对于同一品种来说, 接种的时间不同, 其愈伤组织诱导率也不同。例如, Karnataka 品种在 4—6 月接种的诱导率比较高, 而 Zomba



图 3 生根的试管苗

Fig. 3 Rooted plantlets

A: 在生根培养基上生长 10~15 d 后的试管苗 Rooted plantlets 10-15 d after inoculation; B: 根系发达、等待移栽的试管苗  
Plantlets waiting for transplanting with massive roots

品种在 9—11 月较高。总之,香根草胚性愈伤组织的诱导率受多种因素的影响,如基因型、外植体、季节、生长调节物质等。

从理论上讲,愈伤组织的继代次数越高,其产生变异的可能性就越大。但是,对于大多数植物而言,愈伤组织的继代次数越高,其分化能力就越低,一般在 3~4 代以后,其再生能力就开始下降了<sup>[18,19]</sup>。凌定厚等<sup>[20]</sup>就报道了水稻胚性愈伤的分化成苗率因继代次数的增加而有所下降;Newell 和 Gray<sup>[21]</sup>、姜素云等<sup>[22]</sup>在对黑麦草(*Lolium perenne*)的离体培养研究中发现黑麦草的胚性愈伤组织虽然有很高的再生能力,但在继代培养过程中胚性容易丧失,再生植株易发生体细胞无性系变异;薛美凤等<sup>[23]</sup>在对棉花(*Gossypium hirsutum*)的组培研究中发现,棉花胚性愈伤组织的继代时间不宜超过 1.5 年,随着继代时间的延长,其再生能力逐渐下降,畸形胚发生频率和再生植株不育率逐渐升高。但本研究通过对香根草的连续继代培养发现,即使是继代 24 次(2 年)以后,其体细胞胚仍然保持着很高的再生频率(80%以上),在其他植物中至今还未见到有如此高的再生频率。从本试验开展以来,培育出的愈伤组织的继代次数最高已达 30 次。把继代 11 次的 Karnataka 品种定植到百草园实验基地后,已观察到个别苗的生长有异常现象,表现为叶片明显卷曲,呈匍匐状,紧贴地面生长,植株高度明显比正常苗低矮(图 4)。至于这些变异是否可遗传,能否稳定的遗传下去,仍然有待于进一步的观察和研究。

总的来看,通过上述对香根草腋芽离体培养的研究,一套高效的香根草组织培养再生系统已经建立和优化,并对一些影响因素进行了初步的探讨,为香根草的快速繁殖和遗传转化生物工程等工作的开展奠定了良好基础。



图 4 生长正常的植株和变异植株

Fig. 4 Comparison between normal and aberrant plants

A: 正常植株 Normal plants; B: 发生变异的植株 Aberrant plants

#### 参考文献:

- [1] Troung P, 夏汉平. 第三届国际香根草大会论文集[C]. 北京: 中国农业出版社, 2003.
- [2] Greenfield J C. Vetiver Grass: An Essential Grass for the Conservation of Planet Earth[M]. Haverford: Infinity Publishing, 2002. 1-9.
- [3] 夏汉平, 敖惠修, 刘世忠. 香根草生态工程——实现可持续发展的生物技术[J]. 生态学杂志, 1998, 17(6): 44-50.

- [4] Mucciarelli M, Gallino M, Scannerini S, *et al.* Callus induction and plant regeneration in *Vetiveria zizanioides* [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1993, 35: 267-271.
- [5] Leupin R E, Leupin M, Ehret C, *et al.* Compact callus induction and plant regeneration of a non-flowering vetiver from Java [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2000, 62: 115-123.
- [6] 马国华, 夏汉平, 蒗蕴兰. 香根草不同外植体诱导体细胞胚胎发生和器官发生[J]. *热带亚热带植物学报*, 2000, 8(1): 55-59.
- [7] 马镇荣, 刘卫, 王昌虎, 等. 香根草体细胞胚胎发生的细胞学特点与形成条件[J]. *生态学报*, 2003, 23(7): 1291-1296.
- [8] 韩露, 刘必融, 潘超, 等. 香根草愈伤组织的诱导和快速繁殖[J]. *安徽师范大学学报(自然科学版)*, 2004, 27(4): 443-445.
- [9] 郑贵朝, 胡事君, 张善信. 吴川香根草的离体培养和快速繁殖技术[J]. *中国热带农业*, 2005, (2): 39-40.
- [10] 夏汉平, 刘世忠. 香根草优良生态型筛选研究[J]. *草业学报*, 2003, 12(2): 97-105.
- [11] Ahloowalia B S, Maretzki A. Plant regeneration via somatic embryogenesis in sugarcane [J]. *Plant Cell Report*, 1983, 2: 21-25.
- [12] Vasil V, Vasil I K, Lu C Y. Somatic embryogenesis long term cultures of *Zea mays* L. (Gramineae) [J]. *American Journal of Botany*, 1984, 71: 158-161.
- [13] Li L, Qu R. Development of highly regenerable callus lines and biolistic transformation of turf-type common bermudagrass [*Cynodon dactylon* (L.) Pers.] [J]. *Plant Cell Report*, 2004, 22: 403-407.
- [14] 张俊卫, 唐靖, 包满株. 日本结缕草植株再生体系的研究[J]. *草业学报*, 2005, 14(2): 48-51.
- [15] 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, Tissue and Organ Culture*, 2004, 76: 175-182.
- [16] 马镇荣, 凌定厚. 影响籼稻体细胞无性系雄性不育突变的因素的初探[J]. *华南植物研究所集刊*, 1990, 6: 164-169.
- [17] 马镇荣, 杨冰冰, 夏汉平. 影响香根草体细胞胚胎发生和植株再生因素初探[J]. *热带亚热带植物学报*, 2006, 14(1): 55-60.
- [18] 张磊, 吴殿星, 胡繁荣, 等. 结缕草组织培养及农杆菌介导转化的主要因子优化[J]. *草业学报*, 2004, 13(4): 100-105.
- [19] 胡张华, 陈火庆, 吴关庭, 等. 百慕大成熟胚的组织培养及植株再生[J]. *草业学报*, 2003, 12(1): 85-89.
- [20] 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[J]. *遗传学报*, 1984, 11(1): 26-32.
- [21] Newell C A, Gray J C. Regeneration from leaf-base explants of *Lolium perenne* L. and *Lolium multiflorum* L. [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2005, 80(2): 233-237.
- [22] 姜素云, 胡孝瑞, 晁相蓉, 等. 黑麦草高效丛生芽的发生及离体开花的初步研究[J]. *草业学报*, 2005, 14(6): 100-106.
- [23] 薛美凤, 郭余龙, 李名扬, 等. 长期继代对棉花胚性愈伤组织体胚发生能力及再生植株变异的影响[J]. *西南农业学报*, 2002, 15(4): 19-21.

**Study on tissue culture of *Vetiveria zizanioides***

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

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

**Abstract:** Conventional asexual propagation methods for vetiver seedlings have not matched up with the huge demands of *Vetiveria zizanioides* eco-engineering, bio-technology and genetic engineering of *V. zizanioides*. Therefore, it is necessary to establish tissue culture techniques that are highly effectively for multiplying *V. zizanioides*. Axillary buds of *V. zizanioides* were used as explants to culture *in vitro* on Murashige and Skoog (MS) basal culture medium. The best reducing medium was MS + 2.0 mg/L 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) + 1.0 mg/L 6-benzyladenine (6-BA), and the highest induction frequency was up to 96.7%. The best differentiation medium was MS + 1.0 mg/L 6-BA, and the best rooting medium was 1/2 MS + 0.1 mg/L indole-3-butyric acid (IBA) + 0.1 mg/L paclobutrazol (PP<sub>333</sub>). *V. zizanioides* callus has the typical monocotyledon embryo structure. The regeneration ability of embryogenic calli could be preserved and reached 92.0% after subculturing 18 times. It was still up to 81.6% after 24 subcultures. The establishment of an effective regeneration system of *V. zizanioides* will be valuable for future research in gene engineering and genetic transformation of *V. zizanioides*.

**Key words:** *Vetiveria zizanioides*; somatic embryo; embryogenic callus; subculture; plant regeneration