

石海椒愈伤组织诱导与增殖研究

古 玉, 许 强, 李 龙

(四川农业大学 生命科学与理学院, 四川 雅安 625014)

摘 要: 对石海椒幼嫩叶片和茎段进行了愈伤组织的诱导增殖研究, 以期探寻其诱导和增殖的最佳条件。结果表明: 石海椒的叶片和茎段都能诱导出愈伤组织, 但最佳外植体为叶片, 叶片和茎段在 0.1% 升汞中适合消毒时间为 6 min 和 10 min。叶片最适诱导培养基为 $B_5+0.6\text{ mg/L } 6\text{-BA}+2.0\text{ mg/L NAA}$, 增殖培养基为 $B_5+0.6\text{ mg/L } 6\text{-BA}+1.25\text{ mg/L NAA}$ 。基本培养基和生长调节剂对愈伤诱导的影响是 $\text{NAA} > 6\text{-BA} > \text{基本培养基}$ 。

关键词: 石海椒; 愈伤组织; 诱导条件; 增殖条件

中图分类号: S 567.79 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2011)09-0130-05

石海椒 (*Reinwardtia trigyna* (Roxb.) Planch.) 为亚麻科石海椒属多年生常绿半灌木, 别名金雀梅、黄亚麻、迎春柳。在我国分布于西南, 喜生于石灰岩形成的土壤, 常见于路旁、山坡、岩石或沟边^[1]。因其叶片四季常青、花数多、花期长、花色金黄典雅、香气淡雅、观赏性极高, 目前在热带亚热带园林中广为种植^[2], 也作为盆景栽培^[3]。其嫩枝、茎和叶供药用, 性寒味甘, 能清小肠湿热、利尿。用于黄疸型肝炎、肾炎, 小便不利, 鼻衄^[1]。据初步研究, 其含有强心苷、酚类、三萜皂苷等, 可作为药用植物进一步研究。石海椒以扦插和分株繁殖为主, 大面积和产业化栽培受到限制。亚麻科植物的组织培养研究开展的很多, 但都是关于用作纤维作物的苧麻、亚麻、黄麻、红麻等^[4]。石海椒分属于石海椒属, 极具药用及观赏价值的物种, 和作为纤维作物的麻类有很大差异。目前国内外关于石海椒的报道很少, 仅在观赏价值、栽培方法和生物学特性^[5]等方面有报道, 而对其组织培养研究尚未见报道。该试验旨在利用组培方法筛选出对石海椒愈伤组织诱导最佳的培养方案, 为下一步建立和完善石海椒快速繁育体系, 利用生物技术实施品种繁育、种苗工厂化生产及有效成分获取奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

石海椒幼嫩叶片和嫩茎, 于 6 月中旬采至四川雅安老板山(海拔约 500 m)。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体消毒条件筛选 于试验前到野外取回新鲜的材料, 将茎自顶芽而下剪取 1~2 cm (至少带 3 片叶) 用清水冲洗干净, 分割成小块后用无菌水冲洗 3 遍 75% 的酒精消毒 30 s, 0.1% 升汞浸泡叶片 (3、6、9 min)、茎段 (8、10、12 min), 再用无菌水冲洗 3~5 次。将灭菌材料切割成约 0.2 mm×0.2 mm 小叶片块和 1 cm 左右茎段, 接种于 MS 培养基中。共 6 个处理, 5 次重复, 每重复接种 20 个材料。15 d 后统计外植体污染率和死亡率。污染率(%)=被污染个数/接种个数×100; 死亡率(%)=死亡个数/接种个数×100。试验中所有培养基均添加 3% 蔗糖和 1% 琼脂粉, 调节 pH 5.8。用常规方法配制分装灭菌后备用。所有培养条件都是温度 (25±1) °C, 光照强度 30~40 μmol·m⁻²·s⁻¹, 光照时间 12 h/d。

1.2.2 培养基及激素浓度筛选 以筛选出的最佳表面消毒方式进行愈伤组织诱导试验。试验以幼嫩叶片为外植体, 选取了 MS、B₅ 2 种基本培养基, 附加细胞分裂素 6-BA (0、0.2、0.6、1.0 mg/L)、生长素 NAA (0、0.5、1.25、2.0 mg/L), 进行随机区组试验。共设 32 个处理, 5 次重复, 每重复接种 5 瓶, 每瓶接种 4 个材料。28 d 后统计长出的愈伤组织数量, 观察各种愈伤组织质地、颜色、

第一作者简介: 古玉(1981-), 女, 四川成都人, 硕士, 实验师, 现主要从事药用植物资源开发利用研究工作。

基金项目: 四川农业大学教学质量推进计划资助项目。

收稿日期: 2011-02-14

生长势。计算愈伤组织诱导率。用 Spss 统计分析软件进行方差分析。其中,基本培养基筛选的统计采用配对样本 t 检验(Paired-Samples T Test)进行差异显著性分析。最优配方培养基筛选采用单因素方差分析的多重比较法和多元线性回归分析进行。诱导率(%)=长出愈伤组织个数/接种外植体数 \times 100。

1.2.3 外植体筛选 以幼嫩叶片和茎段为外植体,表面消毒处理后接种到筛选出的最佳激素浓度培养基上进行愈伤组织诱导。共设 2 个处理,5 次重复,每重复接种 20 个材料。28 d 时观察各种愈伤组织质地、颜色、生长势。计算诱导率,用 Spss 统计分析软件进行方差分析。

1.2.4 愈伤组织增殖继代培养 将培养条件筛选试验中外植体诱导出的长势良好、诱导率高的愈伤组织,于生长旺盛期分割后接种于愈伤组织的原始培养基中进行愈伤组织的增殖培养。

2 结果与分析

2.1 外植体消毒时间筛选

将 2 种外植体进行不同的表面消毒时间处理,得到污染率和死亡率。由表 1 可知,叶片和茎段在 0.1%升汞中的消毒时间长短对其污染和死亡情况影响很大,2 种外植体各处理间的污染率和死亡率均达到极显著差异。随着消毒时间的延长,污染率降低,死亡率增高。每种处理都不能达到外植体既无污染又无死亡的理想状态。综合考虑污染和死亡情况,该试验筛选叶片的较优消毒时间为 6 min,茎段为 10 min。

表 1 不同消毒条件下外植体的污染率和死亡率

外植体	消毒时间	污染率	死亡率	99%水平多重比较	
	/ min	/ %	/ %	污染率	死亡率
叶片	3	88.0	9.0	A	C
	6	29.0	31.0	B	B
	9	9.0	80.0	C	A
茎段	8	75.0	95.0	A	A
	10	37.0	34.0	B	C
	12	12.0	76.0	C	B

2.2 基本培养基筛选

将叶片接种在以 MS 和 B₅ 并附加一定浓度激素的

培养基中进行愈伤组织诱导培养,28 d 后将所得数据进行配对样本 t 检验,计算 2 种基本培养基对诱导率的影响,结果见表 2。MS 和 B₅ 培养基相比较,B₅ 培养基更有利于愈伤组织的诱导,其各激素水平下的平均诱导率分别为 32.75%和 27.31%, t 检验得到 Sig. (2-tailed)=0.006, $P<0.01$,故二者的差异达极显著水平。外植体在 2 种培养基上出愈时间相差较小。基本培养基对外植体长出愈伤组织时间影响不大。故后继愈伤组织诱导试验中选择 B₅ 为基本培养基。

表 2 基本培养基对愈伤组织诱导的影响

基本培养基	平均诱导率/ %	标准差	配对样本 T 检验				平均出愈时间/ d
			均数	t	自由度	双尾显著性	
MS	27.31	17.342	1.939	-2.804	79	0.006	9~11
B ₅	32.75						10~12

2.3 培养基、6-BA 和 NAA 对愈伤组织诱导的影响

将 28 d 时得到的愈伤组织诱导率进行多元线性回归分析,分析培养基种类、生长素和细胞分裂素对诱导率影响,结果见表 3。标准化后的多元回归方程 $Y=0.09X_1+0.463X_2+0.666X_3-3.848$ ($P<0.01$) ($R=0.816$,调整 $R^2=0.660$,标准误=17.594)(其中 X_1 代表 MS 或 B₅ 培养基, X_2 代表 6-BA; X_3 代表 NAA)。

表 3 不同培养条件诱导愈伤组织结果的方差分析

模型	平方和	自由度	均方	F	Sig.
回归	96 434.097	3	32 144.699	103.841	0.000
剩余	48 290.747	156	309.556		
总计	144 724.8	159			

根据方差分析 $P<0.01$,方程存在极显著差异,故基本培养基与 6-BA、NAA 间存在真实的直线回归关系,3 个因素对诱导率的影响是 $NAA>6-BA>$ 培养基,在试验浓度内调整 NAA 的浓度能最快改变诱导率。

2.4 最优配方培养基筛选

基本培养基、生长素和细胞分裂素作为 1 个组合,对得到的愈伤组织诱导率进行多重比较分析,以筛选最优组合作为愈伤诱导的培养条件,结果见表 4。

表 4 不同培养基诱导愈伤组织结果

处理	基本培	6-BA 浓度	NAA 浓度	诱导率/ %	诱导率差异		愈伤组织生长状态
	培养基	/ mg · L ⁻¹	/ mg · L ⁻¹		显著性 (95%)		
12	MS	0.6	2	99	a		长势好, 淡黄绿色, 瘤状, 致密
32	B5	1	2	90	ab		长势好, 乳白色, 瘤状, 致密
31	B5	1	1.25	89	b		长势好, 淡黄绿色, 块状, 致密
11	MS	0.6	1.25	73	c		长势较好, 淡黄色, 瘤状, 致密
28	B5	0.6	2	69	cd		长势较好, 淡黄色, 瘤状, 致密
27	B5	0.6	1.25	65	cd		长势较好, 淡黄色, 瘤状, 致密
15	MS	1	1.25	60	d		长势较好, 淡黄色, 瘤状, 致密
16	MS	1	2	60	d		长势较好, 黄褐色, 颗粒状, 致密
24	B5	0.2	2	42	e		长势较好, 黄褐色, 颗粒状, 致密
8	MS	0.2	2	36	e		长势好, 淡黄绿色, 瘤状, 致密
26	B5	0.6	0.5	35	e		长势较好, 淡黄色, 颗粒状, 致密
23	B5	0.2	1.25	34	e		长势较好, 黄褐色, 颗粒状, 致密
14	MS	1	0.5	23	f		长势好, 淡黄绿色, 瘤状, 致密
30	B5	1	0.5	23	f		长势较好, 黄褐色, 颗粒状, 致密
7	MS	0.2	1.25	22	f		长势一般, 淡黄色, 瘤状, 致密
20	B5	0	2	20	fg		长势一般, 乳白色, 颗粒状, 疏松
22	B5	0.2	0.5	20	fg		长势一般, 淡黄色, 颗粒状, 疏松
6	MS	0.2	0.5	18	fg		长势一般, 乳白色, 颗粒状, 疏松
19	B5	0	1.25	15	fg		长势一般, 淡黄色, 颗粒状, 致密
10	MS	0.6	0.5	14	fg		长势一般, 淡黄色, 颗粒状, 致密
18	B5	0	0.5	12	g		长势差, 黄褐色, 颗粒状, 疏松
4	MS	0	2	10	g		长势差, 黄褐色, 颗粒状, 疏松
3	MS	0	1.25	9	gh		长势差, 黄褐色, 颗粒状, 疏松
2	MS	0	0.5	7	gh		长势差, 黄褐色, 颗粒状, 疏松
29	B5	1	0	4	gh		长势差, 黄褐色, 颗粒状, 疏松
9	MS	0.6	0	3	gh		长势差, 黄褐色, 颗粒状, 疏松
13	MS	1	0	3	gh		长势差, 黄褐色, 颗粒状, 疏松
21	B5	0.2	0	3	gh		长势差, 黄褐色, 颗粒状, 疏松
25	B5	0.6	0	3	gh		长势差, 黄褐色, 颗粒状, 疏松
1	MS	0	0	0	h		无
5	MS	0.2	0	0	h		无
17	B5	0	0	0	h		无

从差异显著性多重比较结果可知, 处理 12 和 32 的诱导效果最好, 诱导率达 90%以上, 愈伤组织的生长状态好, 且二者间没有显著差异。处理 31 的效果也好, 诱导率达 89%, 但与处理 12 相比, 差异达显著水平。且高浓度的 NAA 有利于愈伤组织的诱导。故后面试验中筛选高浓度的 NAA 和中高浓度的 6-BA 都能较好的诱导愈伤组织。

2.5 外植体类型筛选

以叶片和茎段为外植体, 按照较优消毒时间消毒后, 接种在筛选出的最优培养基上培养 18 d 后, 观察愈伤组织生长状态, 对所得数据进行方差分析, 所得结果见表 5、6。叶片和茎段作为外植体对诱导率影响大, 其平均诱导率分别为 89%和 78%, 差异达极显著水平 (Sig.=0.008, $P<0.01$), 叶片的诱导率极显著高于茎段诱导率, 故对石海椒而言, 选叶片作为外植体更好。

表 5 不同外植体诱导愈伤组织结果

外植体	平均诱导	平均出愈	愈伤组织状态
	率/ %	时间/ d	
叶片	89	9~ 11	长势好, 淡黄绿色, 瘤状, 致密
茎段	78	12~ 13	长势好, 乳白色, 瘤状, 致密

表 6 外植体筛选方差分析

	平方和	自由度	平均方	F	Sig.
组间	302.5	1	302.5	12.1	0.008
组内	200.0	8	25.0		
总变异	502.5				

2.6 愈伤组织增殖培养

因以上试验中得出以叶片为外植体诱导愈伤组织效果好, 这和培养条件筛选中选用的外植体一致。故将培养条件筛选中诱导率在 60%以上长势好的愈伤组织于 28 d 时转接到原培养基上进行继带增殖培养。以验证其诱导愈伤的良好可靠性, 筛选出了 11、12、15、16、27、

表 7 愈伤组织继代增殖培养结果

处理	愈伤组织生长状态
11	生长快 长势好, 呈白淡黄绿色, 块状 紧实型
12	生长慢 长势较好, 呈黄褐色 颗粒状 紧实型
15	生长较快, 长势较好, 呈白淡黄色, 颗粒状 紧实型
16	生长很慢, 长势一般, 呈淡黄色, 块状 紧实型
27	生长迅速, 长势好, 呈白淡黄绿色, 块状 紧实型
28	生长慢 长势较好, 呈黄褐色 颗粒状 紧实型
31	生长较快, 长势较好, 呈白淡黄色, 块状 紧实型
32	生长很慢, 长势一般, 呈淡黄色, 颗粒状 紧实型

28、31、32 共 8 个组。

在愈伤组织继代增殖培养中, 基本培养基为 MS 和 B₅, 6-BA 浓度为 0.6 和 1.0 mg/L, NAA 为 1.25 和 2.0 mg/L, 比较愈伤组织生长状态, 可以发现, 基本培养基和 6-BA 对其没有影响, 在 2 种培养基细胞分裂素 2 个浓度中愈伤组织的生长都是有快有慢, 长势有好有一般的, 颜色也都有出现黄褐色的, 质地也都有块状和颗粒状的。而比较 NAA 2 个浓度处理中的愈伤组织生长状态, 发现在 1.25 mg/L 中愈伤组织生长速度、长势、颜色和质地都优于 2.0 mg/L 的浓度。故继代增殖培养中应该考虑 NAA 的浓度。筛选出的继代增殖基本培养基为 MS 或 B₅, 细胞分裂素为 0.6 mg/L 或 1.0 mg/L 的 6-BA, 生长素为 1.25 mg/L NAA。

3 讨论

愈伤组织的形成是由表面消毒方式、外植体、生长调节剂、培养基和培养条件等各要素相互作用的复杂过程^[9]。

3.1 表面消毒条件对愈伤组织诱导的影响

外植体表面消毒的好坏是愈伤组织能否形成的先决条件, 表面消毒要求做到既要杀灭表面微生物又要不损害植物内部细胞, 消毒剂的种类和消毒时间对其都有影响。在该试验中采用低浓度的升汞作为表面消毒剂, 但因升汞毒性大、对环境污染严重, 在发达国家已禁止使用, 故在以后试验中应考虑用次氯酸钠等其它毒性较小的消毒剂代替。随着在升汞中浸泡时间的延长, 外植体的污染率降低, 死亡率升高, 这符合一般常识。对不同外植体, 消毒时间不一样, 对石海椒的幼嫩叶片和茎段而言, 在升汞中 6 min 和 10 min 的时间较适宜, 但仍未达到完全无污染、无死亡的理想条件, 这有待以后试验中继续进行探索。

3.2 不同外植体对愈伤组织诱导的影响

能用于愈伤组织培养的材料来源广泛, 理论上来说凡是能从植物组织抑制性下脱分化出来后具有再分化能力的组织都可以作为外植体。但实际应用中, 要考虑组织脱分化和获取的难易程度。该试验中因在 6 月中旬取材, 开花结实期已过, 获取幼嫩叶片和茎段最容易。从试验结果来看, 叶片和茎段都是理想的外植体材料, 其在 B₅ + 0.6 mg/L 6-BA + 2.0 mg/L NAA 培养基中诱导率分别为 89% 和 78%, 诱导率高, 相比较而言, 叶片的诱导效果显著好于茎段的诱导效果, 且越靠近叶柄和叶

脉处越容易形成愈伤组织。

3.3 培养基对愈伤组织诱导的影响

培养基的种类和生长调节剂种类及其配比在组织培养中起重要作用。尤其生长调节剂是调控愈伤组织形成的关键因素^[7]。

在该试验中, 就常用于愈伤组织诱导的 2 种培养基 MS 和 B₅ 而言, 在其它条件完全相同时, B₅ 的平均诱导率比 MS 的平均诱导率高 5.43%, 差异极显著。故试验中选择 B₅ 作为基本培养基。该研究表明, 不同浓度激素对愈伤诱导有明显不同。因考虑到 2, 4-D 对愈伤组织分化成苗有毒害作用, 故试验中选用 NAA 为生长素 6-BA 为细胞分裂素。从试验结果看, 高浓度的 NAA 有利于愈伤诱导, 2.0 mg/L 的 NAA 诱导效果明显好于 1.25 mg/L 时。而 6-BA 在中浓度时效果都较好, 0.6 mg/L 和 1.0 mg/L 时都能很好诱导出愈伤组织。考虑到成本及低碳环保因素, 选择 0.6 mg/L 的 6-BA 更好。就基本培养基、NAA 和 6-BA 而言, 三者对愈伤组织诱导的影响依次为 NAA > 6-BA > 基本培养基。在石海椒愈伤组织诱导时, 应着重考虑 NAA 的浓度。

3.4 培养基对愈伤组织增殖培养

愈伤组织的增殖和多种因素有关, 光照、pH、培养温度、培养基的种类和生长调节剂都是影响因子。在该试验中, 着重考虑了培养基对其增殖的影响, 至于培养条件的影响有待进一步研究。从试验中可以看出, 诱导效果好的培养基组合, 同样适用于愈伤的增殖。但是高浓度的 NAA 会加速愈伤组织的老化, 1.25 mg/L NAA 对愈伤组织的增殖效果较好。

4 结论

石海椒的叶片和茎段都能诱导出愈伤组织, 但最佳外植体为叶片, 叶片和茎段在 0.1% 升汞中适合消毒时间为 6 min 和 10 min。叶片最适诱导为 B₅ + 0.6 mg/L 6-BA + 2.0 mg/L NAA。增殖培养基 B₅ + 0.6 mg/L 6-BA + 1.25 mg/L NAA。基本培养基和生长调节剂对愈伤诱导的影响是 NAA > 6-BA > 基本培养基。

参考文献

[1] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编(下册)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 230.

[2] 苏雪痕, 宋希强, 苏晓黎. 城镇园林植物规划方法及其应用(3)——热带、亚热带植物规划[J]. 中国园林, 2005(4): 63.

[3] 刘方农, 刘联仁. 石海椒的开发利用[J]. 中国花卉盆景, 2008(5): 20-21.

[4] 曹雅琴, 郭清泉, 刘峰. 麻类作物组织培养研究进展[J]. 作物研究, 2007, 21(5): 679-684.

[5] 彭世逞. 野生花卉石海椒的生物学特性观察和栽培[J]. 西昌学院学报(自然科学版), 2008, 22(2): 1-3.

[6] 陈耀峰. 植物组织与细胞培养[M]. 北京: 中国农业出版社, 2007: 58-64.

[7] 徐飞, 于元杰. 白首乌愈伤组织的诱导与增殖[J]. 北方园艺, 2010(14): 140-142.

葡萄组织培养快速繁殖体系研究

李国树, 邱璐, 徐成东, 范树国

(楚雄师范学院化学与生命科学系 滇中高原生物资源开发与利用研究所, 云南 楚雄 675000)

摘要:以葡萄茎尖、茎段、叶柄、根尖为外植体, 对葡萄外植体的选择、愈伤诱导、茎叶分化苗、不定根诱导及试管苗的练苗移栽过程进行研究。结果表明: 外植体以茎尖为最佳, 茎尖愈伤诱导最适培养基: $1/2MS+6-BA\ 1.0\ mg/L+IBA\ 0.10\ mg/L$, 诱导率达 95%; 茎叶分化以 $1/2MS+6-BA\ 1.5\ mg/L+IBA\ 0.10\ mg/L$, 分化率达 100%; 生根培养以 $1/2MS+IBA\ 1.0\ mg/L$ 为佳, 生根率达 90.3%。

关键词: 葡萄; 组织培养; 快速繁殖

中图分类号: S 663.103.6 **文献标识码:** B **文章编号:** 1001-0009(2011)09-0134-03

葡萄是葡萄科(Vitaceae)葡萄属(*Vitis*)多年落叶藤本植物, 因其栽培品种多、适应性强、果实营养丰富, 广泛用于鲜食、酿酒和加工制作葡萄干、葡萄汁等食品而成为在全国各地广泛栽培的主要果树之一。

生产上葡萄育苗主要采用扦插繁殖, 但长期采用扦插繁殖, 容易导致品种退化、尤其在南方多雨地区, 扦插苗易受病虫害感染影响苗木质量。植物组织培养^[1]就是将植物体的组织、器官、细胞应用无菌操作, 使其在人工条

件下能够继续生长, 甚至分化发育成一完整的植物的过程。植物组织培养技术可用于新品种的快速繁殖, 不受季节、地区、气候、病虫害等因素影响, 可周年进行生产, 因此, 该试验从葡萄组织培养的外植体选择、愈伤组织、茎叶分化、不定根诱导优化及试管苗的练苗移栽过程进行研究, 系统研究葡萄组织培养快速繁殖体系, 为葡萄组培快速繁殖和大规模工厂化育苗体系提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

葡萄茎尖、茎段、叶柄、根尖 4 种外植体材料取自楚雄州果园葡萄生产园。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体处理 供试材料带回实验室后, 将材料切成 3~5 cm 的节段, 用洗涤剂泡洗 5 min 后, 再用无菌水冲洗 5~6 次, 转至超净工作台上用 70% 的消毒酒精消毒 10 s, 迅速倒出酒精, 用无菌水清洗 3~5 次, 滤干水分后用 0.1% $HgCl_2$ 消毒 4 min 后再用无菌水清洗 8~10 次。用消过毒的剪刀剪段, 除去两端伤口, 长约在

第一作者简介: 李国树(1969-), 男, 彝族, 云南永仁人, 高级讲师, 现从事植物学及植物资源开发与利用研究工作。E-mail: hxxlgs@xtc.edu.cn。

基金项目: 楚雄师范学院学术后备人才资助项目(08YJRC22); 云南省植物学重点学科建设资助项目(05YJJSXK03); 云南省应用基础研究计划资助项目(2008CD218); 云南省中青年学术技术带头人后备人才计划资助项目(2006PY01-61)。

收稿日期: 2011-01-18

Study on Callus Induction and Proliferation of *Reinwardtia trigyna* (Roxb.) Planch

GU Yu, XU Qiang, LI Long

(College of Biology and Science, Sichuan Agricultural University, Yaan, Sichuan 625014)

Abstract: The leaves and stems of *Reinwardtia trigyna* (Roxb.) Planch were used as explants to study the callus induction and proliferation, in order to explore the optimum conditions of induction and proliferation. The results indicated that both leaves and stems could induce callus, but the best explant was leaf. The suitable sterilization time for leaves and stems with 0.1% mercury bichloride were 6 min and 10 min. The optimal induction medium for leaf were $B_5+0.6\ mg/L\ 6-BA+2.0\ mg/L\ NAA$, and proliferation medium were $B_5+0.6\ mg/L\ 6-BA+1.25\ mg/L\ NAA$. Impact on callus induction were $NAA>6-BA>$ basic medium.

Keywords: *Reinwardtia trigyna* (Roxb.) Planch; callus; induction condition; proliferation condition