

# 木榄愈伤组织诱导影响因子研究

鲁彦君

(西北农林科技大学 林学院,陕西 杨凌 712100)

**摘 要:**以木榄幼叶为外植体,进行其愈伤组织诱导的影响因子研究,通过灭菌条件、培养基成分、添加剂种类、外源植物激素浓度试验,比较外植体褐化率与愈伤组织诱导率。结果表明:75%乙醇灭菌 30 s 后在 2%(体积分数 v/v)NaClO 溶液灭菌 20 min 是木榄幼叶表面消毒适宜条件;氨基酸培养基是基础培养基;45 ℃热激与添加 1.0 mmol·L<sup>-1</sup> 抗坏血酸均可降低褐化率;AA 培养基+0.50 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D+0.50 mg·L<sup>-1</sup> TDZ+1.00 mmol·L<sup>-1</sup> 维生素 C 或 AA 培养基+0.50 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D+0.50 mg·L<sup>-1</sup> CPPU+1.00 mmol·L<sup>-1</sup> 维生素 C 均可得大于 50%的愈伤诱导率。因此,克服外植体褐化与应用 CPPU 或 TDZ 作为细胞分裂素是木榄愈伤组织诱导成功的关键。

**关键词:**木榄;愈伤组织诱导;外植体褐化;细胞分裂素

**中图分类号:**S 796;Q 785 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)15-0092-05

红树植物是红树林生态系统的重要组成树种,一些种类具有很高工业与药用价值<sup>[1]</sup>。由于围海造田、养殖、过度砍伐等因素,全世界红树林以每年 100 万 hm<sup>2</sup> 的速度消失<sup>[2]</sup>,这种状态直接制约红树林生态系统物种多样性发展<sup>[3]</sup>。此外,种子数量下降也成为制约红树繁殖的重要问题<sup>[1]</sup>。因此,组织培养技术的探索将有助于红树植物(尤其是特殊类群)的繁殖与利用。

少数红树植物的微繁技术已有报道,如番杏科海马齿属海马齿(*Sesuvium portulacastrum*)<sup>[4]</sup>、大戟科海漆属海漆(*Excoecaria agallocha*)<sup>[5]</sup>、爵床科老鼠簕属老鼠簕(*Acanthus iliciifolius*)<sup>[6]</sup>与马鞭草科海榄雌属海榄雌(*Avicennia marina*)<sup>[1]</sup>。几种红树植物愈伤与悬浮细胞也有被应用于的相关抗性生理研究中,AKATSU 等<sup>[7]</sup>诱导海桑科海桑属杯萼海桑(*Sonneratia alba*)愈伤组织,并获得细胞悬浮培养系,确定一定浓度盐离子(如 NaCl 或 MgCl<sub>2</sub>)可诱导愈伤组织生长<sup>[8]</sup>。MIMURA 等<sup>[9-10]</sup>从红树科木榄属海莲(*Bruguiera sexangula*)叶片和胚轴上诱导出愈伤,认为氨基酸培养基才是最适宜培养基,且高盐处理可诱导组织或器官再生。木榄属秋茄(*Kandelia candel*)的愈伤组织诱导尚鲜见报道,KAAI 等<sup>[11]</sup>提出可

能原因是内源高浓度 ABA 和低活性 GAs 对愈伤组织生长的抑制。综上,红树植物的组织培养技术还处于探索阶段,大多数红树植物(包括木榄)组织培养体系依然尚未建立。

木榄(*Bruguiera gymnorhiza* (L.) Savigny)是红树科木榄属非泌盐红树植物的代表,也是构成我国红树林的优势树种,该试验旨在探索木榄愈伤组织诱导的影响因子,为扩大木榄繁殖与应用提供研究途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

2013 年 1 月初,将采自海南东寨港红树林自然保护区(北纬 19°51',东经 110°24')发育状况良好、长度及质量相近的木榄成熟胚轴栽于北京林业大学生物科学与技术学院苗圃内有托盘的花盆(盆口径 18 cm,高 15 cm)中,砂培,每盆 50 株胚轴,定期浇水以保持土壤湿度。生根后,每 14 d 浇 1 次 Hoagland 完全营养液(每盆 500 mL)。温度保持 25~28 ℃,光周期 16 h,暗周期 8 h。0.25%植物凝胶(P8169-500G;Sigma;北京科百奥生物科技有限责任公司)。

### 1.2 试验方法

1.2.1 灭菌条件试验 当木榄生出 2 对真叶,随机挑选幼嫩叶片作为外植体。叶片经如下处理:在自来水下冲洗叶片 3~4 h,去叶表脏物,再在 75%酒精溶液(加 0.2 mL 吐温 20)中表面灭菌 30 s;然后用 2%、3%、4%(体积分数 v/v)NaClO 溶液(加 0.2 mL 吐温 20)处理 10、15、20、25 min;最后用 30、40、45、55 ℃无菌水对外植

**作者简介:**鲁彦君(1984-),女,博士,讲师,现主要从事植物逆境生理教学与科研工作。E-mail:luyanjun032@126.com.

**基金项目:**中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(2452015044);西北农林科技大学博士科研启动基金资助项目(2013BSJJ049)。

**收稿日期:**2016-04-22

体进行热激处理 2 min。处理完毕,将叶片剪成 5 mm×5 mm 的方形叶块,将 6 个叶块(平铺或垂直培养基)接种于盛有 30 mL 培养基的培养皿(直径 90 mm)或锥形瓶(100 mL)中。120 ℃下灭菌 30 min。

1.2.2 培养基成分试验 培养基:MS 培养基或氨基酸(AA)培养基,成分参照 MIMURA 等<sup>[10]</sup>的方法。热激温度 30、40、45、55 ℃。添加剂种类与浓度:维生素 C 1、2、3、4 mmol·L<sup>-1</sup>;PVP(质量分数 w/v)0.10%、0.50%、1.00%、2.00%。植物生长调节物质浓度设计参照 4 因素 3 水平的正交表进行,生长素 2,4-D 浓度为 0.05、0.10、0.50、1.00、2.50 mg·L<sup>-1</sup>;嘌呤类细胞分裂素 6-BA 浓度为 0.10、0.50、1.00 mg·L<sup>-1</sup>;苯基脲类细胞分裂素 CPPU 浓度为 0.01、0.05、0.50/0.05、0.50、2.00 mg·L<sup>-1</sup>;苯基脲类细胞分裂素 TDZ 浓度为 0.05、0.50、2.00 mg·L<sup>-1</sup>;NaCl 浓度为 0.10、1.00、10.00 mg·L<sup>-1</sup>。以上培养基 pH 6.25,3%蔗糖,0.25%植物凝胶。接种后暗培养 7 d 后转入光培养,培养温度 25 ℃。

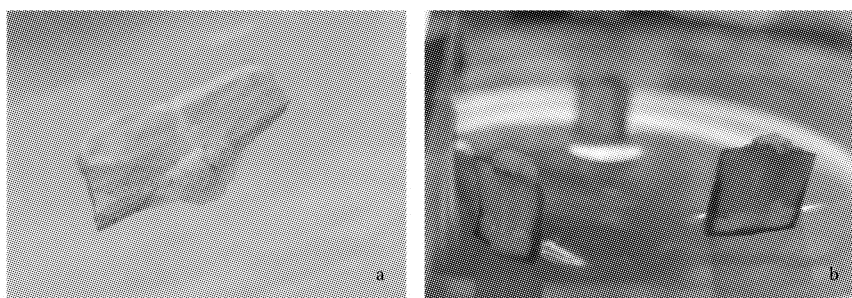
### 1.3 数据分析

愈伤诱导率为每一培养皿(或锥形瓶)中产生愈伤组织的外植体个数与接种外植体总个数之比(每个培养皿或者锥形瓶当作 1 个重复,共 5 次重复)。污染率、褐化率计算方法同愈伤诱导率。采用 SPSS 13.0 统计软件处理数据,用单因素方差分析(ONEWAY-ANOVA)检验不同处理下愈伤诱导率的差异显著性,采用 Duncan ( $P<0.05$ )法进行差异显著性多重比较。

## 2 结果与分析

### 2.1 形态学观察

3 d 后,外植体叶块出现不同程度褐化;14~21 d 后,外植体叶块的维管束处开始生长乳白色、疏松、半透明组织(图 1a),将这部分组织进行继代培养。28~35 d 后,乳白色的组织开始变黄,变硬,呈颗粒状,叶块边缘褐化程度加剧,一直愈伤组织进一步生长(图 1b)。



注:a. 14~21 d;b. 28~35 d。

Note:a. 14-21 days;b. 28-35 days.

图 1 木榄叶块维管束愈伤组织

Fig. 1 Callus initiated on the vascular bundle of the leaf

### 2.2 灭菌浓度与时间对灭菌效果的影响

木榄叶片有厚角质层,外植体较易灭菌。以浓度为 2%、3%、4%(v/v)的 NaClO 溶液灭菌 10、15、20、25 min 后,表 1 显示,在灭菌时间 10 min 和 15 min 均容易被污染。为减少 NaClO 溶液对外植体造成的伤害,后续试验均采用 2%浓度的 NaClO 溶液灭菌 20 min。

### 2.3 热激处理与添加剂对外植体褐变率的影响

木榄外植体虽不易污染,却极易褐化,该试验采取了几种防褐化方法。一是对外植体进行不同温度热激处理;二是添加不同浓度防褐化剂抗坏血酸(维生素 C)或聚乙烯吡咯烷酮(PVP),14 d 后观察褐化发生情况。从图 2 可以看出,45 ℃热激或 1 mmol·L<sup>-1</sup>抗坏血酸处理的褐化率较小,分别是 13.4%与 6.4%,而添加任一浓度 PVP 对褐化率的影响并不明显。此外,通过 MS 培养基与 AA 培养基对木榄愈伤诱导的试验发现,木榄叶片在 MS 培养基中诱导率为 0,因此后续试验选择 AA 作基本培养基。

表 1 不同浓度 NaClO 与不同消毒时间对外植体污染率的影响

Table 1 Effect of different NaClO concentration and sterilizing time on contamination rate of explant

NaClO 灭菌浓度 Sterilizing concentration (v/v)/%	灭菌时间 Sterilizing time /min	外植体数 Explant number /个	污染数 Contamination number /个	污染率 Contamination rate /%
2	10	30	30	100.00
	15	30	25	83.33
	20	30	0	—
	25	30	0	—
3	10	30	25	83.33
	15	30	15	50.00
	20	30	0	—
	25	30	0	—
4	10	30	15	50.00
	15	30	10	33.33
	20	30	0	—
	25	30	0	—

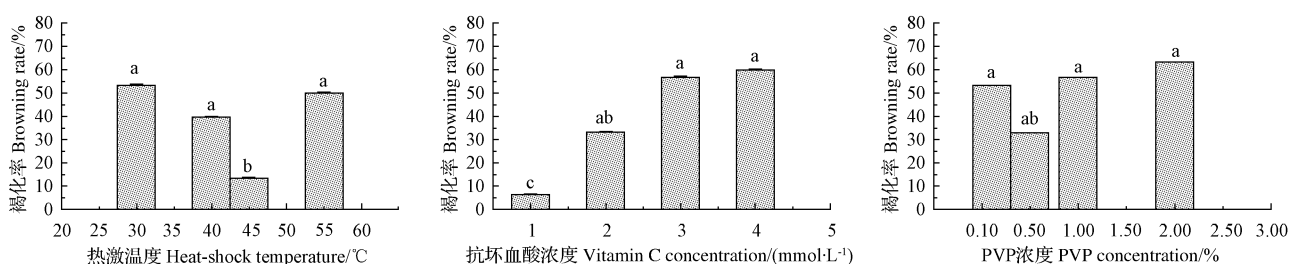


图2 外植体热激处理与添加剂对外植体褐变率的影响

Fig. 2 Effect of heat-shock and additives on browning rate of explant

## 2.4 外源激素对愈伤诱导率的影响

接种前,用 45 °C 的无菌水对外植体热激,并在培养基中添加 1 mmol · L<sup>-1</sup> 的抗坏血酸降低褐化率。经过 4 因素 3 水平正交实验,21 d 后愈伤组织出现在叶块维管束周围。由表 2 可知,CPPU 处理的极差最大,且以 0.50 mg · L<sup>-1</sup> 处理得到的愈伤诱导率最大,2,4-D 处理极差次之,浓度为 0.50 mg · L<sup>-1</sup> 时得到的愈伤诱导率最

大,6-BA 与 NaCl 对愈伤组织诱导的影响较小,6-BA 浓度为 0.10 mg · L<sup>-1</sup>,NaCl 浓度为 1.00 mg · L<sup>-1</sup> 时愈伤组织诱导率较大。因此,对愈伤诱导有影响的因子从大到小依次排列:CPPU>2,4-D>6-BA>NaCl,木榄愈伤诱导的最适宜培养基是 AA 培养基+0.50 mg · L<sup>-1</sup> 2,4-D+0.50 mg · L<sup>-1</sup> CPPU+0.10 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA+1.00 mmol · L<sup>-1</sup> NaCl,诱导率为 55.67%。

表 2 不同激素浓度对叶片愈伤诱导率的影响

Table 2 Effect of different hormones concentration on callus induction rate of leaf

处理 Treatment	2,4-二氯苯氧乙酸 2,4-D/(mg · L <sup>-1</sup> )	N-(2-氯-4-吡啶基)N'-二苯基脲 CPPU/(mg · L <sup>-1</sup> )	6-苄氨基腺嘌呤 6-BA/(mg · L <sup>-1</sup> )	氯化钠 NaCl/(mmol · L <sup>-1</sup> )	诱导率 Callus initiation rate/%
1	0.05	0.01	0.10	0.10	—
2	0.05	0.05	0.25	1.00	11.30±0.11cd
3	0.05	0.50	0.50	10.00	17.00±0.06bc
4	0.50	0.01	0.25	10.00	2.83±0.05cd
5	0.50	0.05	0.50	0.10	33.50±0.11b
6	0.50	0.50	0.10	1.00	55.67±0.13a
7	2.50	0.01	0.50	1.00	—
8	2.50	0.05	0.10	10.00	22.33±0.07bc
9	2.50	0.50	0.25	0.10	27.67±0.1b
y1	9.43	0.94	26.00	20.39	—
y2	30.67	22.38	13.93	22.32	—
y3	16.67	33.45	16.83	14.05	—
R	21.24	32.51	12.07	8.27	—

为筛选更适宜培养基,选择正交实验中对愈伤诱导影响最关键的 2 个因子:CPPU、2,4-D,将 2,4-D 浓度范围缩小到 0.10、0.50、2.00 mg · L<sup>-1</sup>,由于未添加 6-BA, CPPU 浓度范围则扩大到 0.05、0.50、2.00 mg · L<sup>-1</sup>。表 3 显示了植物生长素 2,4-D 浓度、细胞分裂素 CPPU 浓度与愈伤诱导率间的关系,最适培养基为 AA 培养基(维生素 C)+0.50 mg · L<sup>-1</sup> 2,4-D+0.50 mg · L<sup>-1</sup> CPPU,诱导率为 69.33%。此外,AA 培养基(维生素 C)+2.00 mg · L<sup>-1</sup> 2,4-D+0.05 mg · L<sup>-1</sup> CPPU 与 AA 培养基(维生素 C)+2.00 mg · L<sup>-1</sup> 2,4-D+0.50 mg · L<sup>-1</sup> CPPU 的诱导率分别达 44.50%和 41.67%。

进一步比较苯基脲类细胞分裂素(CPPU、TDZ)与嘌呤类细胞分裂素(6-BA)在愈伤诱导中的作用,设计了 2,4-D(0.10、0.50、2.00 mg · L<sup>-1</sup>)与 6-BA(0.05、0.50、2.00 mg · L<sup>-1</sup>)不同浓度的组合,但 9 种组合诱导率均为 0(数据未列出)。

表 3 不同 2,4-D 和 CPPU 浓度对愈伤诱导率的影响

Table 3 Effect of different 2,4-D and CPPU concentration on callus induction rate

处理 Treatment	2,4-二氯苯氧乙酸 2,4-D (mg · L <sup>-1</sup> )	N-(2-氯-4-吡啶基) N'-二苯基脲 CPPU/(mg · L <sup>-1</sup> )	诱导率 Callus initiation rate/%
AA 培养基+维生素 C	0.10	0.05	—
AA 培养基+维生素 C	0.10	0.50	—
AA 培养基+维生素 C	0.10	2.00	—
AA 培养基+维生素 C	0.50	0.05	16.67±0.11cd
AA 培养基+维生素 C	0.50	0.50	69.33±0.14a
AA 培养基+维生素 C	0.50	2.00	—
AA 培养基+维生素 C	2.00	0.05	44.50±0.13b
AA 培养基+维生素 C	2.00	0.50	41.67±0.14bc
AA 培养基+维生素 C	2.00	2.00	25.16±0.11c

TDZ 是近年兴起的用于植物组织培养的高效植物生长调节剂,不同 2,4-D(0.10、0.50、2.00 mg · L<sup>-1</sup>)浓度与 TDZ(0.05、0.50、2.00 mg · L<sup>-1</sup>)浓度配比对木榄愈伤

诱导率的影响如表 4 所示,  $0.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  2,4-D +  $0.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  TDZ 或  $2.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  TDZ 组合中愈伤诱导率均较高, 分别是 69.50% 与 58.33%。但当 2,4-D 浓度为  $2.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 愈伤诱导率为 0。无论 2,4-D 浓度低 ( $0.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 或高 ( $2.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 与 CPPU 的组合都能有效诱导愈伤(表 3), 但与 TDZ 组合时, 低浓度的 2,4-D 才有利于愈伤诱导。

表 4 不同 2,4-D 和 TDZ 浓度对愈伤诱导率的影响

Table 4 Effect of different 2,4-D and TDZ concentration on callus induction rate

处理 Treatment	2,4-二氯苯氧乙酸 2,4-D /( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	1-苯基-3-(1,2,3-噁二唑-5-基)脲 TDZ/( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	诱导率 Callus initiation rate/%
AA 培养基+维生素 C	0.10	0.05	25.00±0.14c
AA 培养基+维生素 C	0.10	0.50	47.17±0.09b
AA 培养基+维生素 C	0.10	2.00	—
AA 培养基+维生素 C	0.50	0.05	27.67±0.13c
AA 培养基+维生素 C	0.50	0.50	69.50±0.15a
AA 培养基+维生素 C	0.50	2.00	58.33±0.14ab
AA 培养基+维生素 C	2.00	0.05	—
AA 培养基+维生素 C	2.00	0.50	—
AA 培养基+维生素 C	2.00	2.00	—

### 3 结论与讨论

#### 3.1 褐变的发生与对策

褐变现象是外植体从组织表面向培养基释放分泌物, 分泌物氧化后使培养基与外植体变褐色, 引起外植体死亡<sup>[12]</sup>。褐变现象发生主要在于酶促反应, 即植物组织中的多酚氧化酶(PPO)被激活后作用于多酚类物质形成褐色的醌类物质, 醌类物质在络氨酸酶作用下与蛋白质聚合, 引起培养物体内酶系统失活, 阻碍生长<sup>[13]</sup>。红树植物长期在海水浸渍中, 积累大量单宁物质以增强抗病虫害与抗海水腐蚀能力, 单宁可与其它化合物交联形成酚类化合物, 而酚类化合物恰是酶促反应的底物<sup>[14]</sup>。该试验取材于木榄胚轴生出的嫩叶, 单宁积累严重, 成为影响红树组织培养的最大限制性因素。

该试验采取多种方法降低褐变发生率, 结果表明, 热激与抗坏血酸的添加可以降低褐变率。热激反应已被证实广泛存在于生物中<sup>[15]</sup>, 其诱导一系列相关基因表达产生热激蛋白(HSPs), HSPs 抑制 PAL 活性, 从而阻碍由 PAL 催化的酚类化合物合成, 防止褐变发生<sup>[16-17]</sup>。短期热激处理可降低受伤莴苣中 PAL 活性, 减少酚类化合物积累, 降低组织褐变率<sup>[18]</sup>。用  $45^\circ\text{C}$  无菌水热激外植体 90 s, 显著降低木榄褐变率, 故此处理可应用于防褐变中。抗坏血酸是一种抗氧化剂, 可改变外植体周围的氧化还原电势, 抑制酚类物质氧化。一般认为, 抗坏血酸对植物无副作用, 在使用中可不受限制<sup>[13]</sup>。该试验发现添加  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度的抗坏血酸对减少木榄褐

变率有效。PVP 是酚类物质的吸附剂, 由于植物酚类物质的多样化, PVP 具有不同分子量, 因而它在植物组织培养中对褐变的抑制作用不具普遍性<sup>[19]</sup>。该试验将其应用于外植体预处理以及培养基添加中, 并未降低木榄褐变率。

#### 3.2 AA 培养基和外源植物激素对愈伤诱导率的作用

MS 培养基是植物组织培养最广泛使用的培养基, 该试验结果显示 MS 培养基并不适用于木榄愈伤诱导, MIMURA 等<sup>[10]</sup>证实 MS 培养基对海莲的愈伤诱导率也较低。AA 与 MS 培养基的不同在于, AA 培养基成分的甘氨酸、谷氨酰胺、精氨酸与天冬氨酸 4 种氨基酸取代了 MS 培养基中的大量元素  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  和  $\text{KNO}_3$ 。而红树植物生长在含有丰富养分的淤泥中, AA 培养基有机营养取代了无机离子, 其成分更接近于木榄实生环境<sup>[10]</sup>, 因此 AA 培养基更有利于木榄愈伤的诱导。此外, 培养基中无机离子含量高也是引起褐化的因素之一<sup>[11]</sup>。

不同激素选择与组合中, 诱导率最高的是 AA 培养基 +  $0.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  2,4-D +  $0.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  TDZ +  $1.00 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  维生素 C, 诱导率次高的是 AA 培养基 +  $0.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  2,4-D +  $0.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  CPPU, 且细胞分裂素 CPPU 与 TDZ 比 6-BA 对木榄愈伤诱导效果更有效。

CPPU 与 TDZ 均属于苯基脲类衍生物 (phenyl urea derivative, PUD), 是具有广泛生物活性的细胞分裂素。PUD 具有一般细胞分裂素的功能, 还具有诱导细胞分裂与愈伤组织生长的作用<sup>[20]</sup>。TDZ 有益于葡萄芽切段<sup>[21]</sup>与牛皮杜鹃叶片<sup>[22]</sup>形成愈伤组织, 且可可树愈伤组织生长速度与 TDZ 浓度变化有关<sup>[23]</sup>。目前认为 TDZ 在形态发生中的作用是通过内源激素代谢的调控与酶动力的改变来实现的, TDZ 具有类似于细胞分裂素的活性, 能诱导内源细胞分裂素合成与积累<sup>[24]</sup>, 还能增强 ATP、Rubisco 和戊糖磷酸途径的酶活性<sup>[25]</sup>。CPPU 在诱导愈伤与促进芽发育、果实增大以及延缓衰老等方面具显著生理活性。CPPU 有与嘌呤类细胞分裂素相似的生理作用, 其作用机制也相同, 但 CPPU 生理活性远大于嘌呤类细胞分裂素, 测定烟草愈伤组织中 CPPU 有效浓度明显低于 6-BA<sup>[26]</sup>。其生理活性强是因为在某些植物叶片的类囊体膜上存在一种细胞分裂素特异性结合的多肽, 不同植物内源细胞分裂素都会与这种多肽竞争性结合, 而脲类衍生物竞争能力强于嘌呤类<sup>[26]</sup>, 这也是该试验中 CPPU 得到高诱导率的原因。

综上, 木榄愈伤诱导困难的主要原因是含有大量单宁易褐化。该试验在克服褐化的基础上, 利用具有高生物活性的植物激素 CPPU 与 TDZ, 在叶片维管束诱导出愈伤组织, 但木榄的组织培养技术仍有待进一步研究。

## 参考文献

- [1] AL-BAHRANY A M, AL-KHAYRI J M. Micropropagation of grey mangrove *Avicennia marina* [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2003, 72(1):87-93.
- [2] MOHAMED A D. Mangrove forests: Valuable resources under the threat of development [J]. Ocean Yearbook, 1996(12):247-269.
- [3] OGITA S, YEUNG E C, SASAMOTO H, et al. Histological analysis in shoot organogenesis from hypocotyl explants of *Kandelia candel* (Rhizophoraceae) [J]. Journal of Plant Research, 2005, 117(6):457-464.
- [4] MOORTHY P, KATHIRESAN K. Photosynthetic pigments in tropical mangroves: impacts of seasonal flux of uv-b radiation and other environmental attributes [J]. Botany Marina, 1997, 40(4):341-350.
- [5] SRINIVASA R, EGANATHAN P, ANAND A, et al. Protocol for in vitro propagation of *Excoecaria agallocha* L., a medicinally important mangrove species [J]. Plant Cell Reports, 1998, 17(11):861-865.
- [6] EGANATHAN P, RAO C. Manual on vegetative and micropropagation of mangroves [M]. M S Swaminathan Research Foundation, Chennai, India, 2001.
- [7] AKATSU M, HOSOI Y, SASAMOTO H, et al. Purine metabolism in cells of a mangrove plant, *Sonneratia alba*, in tissue culture [J]. Journal of Plant Physiology, 1996, 149(1-2):133-137.
- [8] KAWANA Y, SASAMOTO H. Stimulation effects of salts on growth in suspension culture of a mangrove plant, *Sonneratia alba*, compared with another mangrove, *Bruguiera sexangula* and non-mangrove tobacco BY-2 cells [J]. Plant Biotech, 2008, 25(2):151-155.
- [9] MIMURA T, MIMURA M, WASHITANI -NEMOTO S, et al. NaCl-dependent growth, ion content and regeneration of calluses initiated from the mangrove plant, *Bruguiera sexangula* [J]. Journal of Plant Research, 1997a, 110(1):31-36.
- [10] MIMURA T, MIMURA M, WASHITANI -NEMOTO S, et al. Efficient callus initiation from leaf of mangrove plant, *Bruguiera sexangula* in amino acid medium; effect of nacl on callus initiation [J]. Journal of Plant Research, 1997b, 110(1):25-29.
- [11] KAAI F K Y, SASAMOTO H. The relation between recalcitrancy of a mangrove plant, *Kandelia obovata*, and high endogenous level of abscisic acid [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2008, 94(2):125-130.
- [12] 李莎. 植物组织培养中外植体褐变的研究进展 [J]. 陕西林业科技, 2008(1):7-10.
- [13] 姚洪军, 罗晓芳. 植物组织培养外植体褐变的研究进展 [J]. 北京林业大学学报, 2004, 15(4):426-428.
- [14] 林益明, 向平, 林鹏. 红树林单宁的研究进展 [J]. 海洋科学, 2005, 29(3):56-63.
- [15] MAIO A D, LIS H, GERSHONI J M, et al. Identification of glycoproteins that are receptors for peanut agglutinin on immature (cortical) mouse thymocytes [J]. Febs Letters, 1986, 194(1):28-32.
- [16] MARTIN-DIANA A H, RICO D, BARRY-RYAN C, et al. Effect of heat shock on browning-related enzymes in minimally processed iceberg lettuce and crude extracts [J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2005, 69(9):1677-1685.
- [17] 杨玲, 黄绵佳, 葛红. 热激处理在抑制植物组织褐变中的应用 [J]. 热带农业科学, 2007, 27(3):62-68.
- [18] LOAIZA-VELARDE J. Heat shocks applied either before or after wounding reduce browning of lettuce leaf tissue [J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2001, 126(2):227-234.
- [19] 陈吉裕, 张文玲. 延龄草无菌培养体系的建立及防褐变措施 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(5):40-44.
- [20] 耿会玲, 田鹏, 麻妙锋. PUD类细胞分裂素的研究与应用 [J]. 动物医学进展, 2003, 24(2):58-60.
- [21] PREECE J E, HUETTEMAN C A, ASHBY W C, et al. Micro-and cutting propagation of silver maple. I. results with adult and juvenile propagules [J]. Journal of the American Society for Horticultural Science American Society for Horticultural Science, 1991, 116(1):142-148.
- [22] 刘森, 曹后男, 宗成文, 等. TDZ对牛皮杜鹃叶片分化及继代增殖的影响 [J]. 西北农业学报, 2012, 21(12):158-162.
- [23] LI Z J, TRAORE A, MAXIMOVA S, et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration from floral explants of Cacao (*Theobroma cacao* L.) using thidiazuron [J]. In vitro Cellular and Developmental Biology Plant, 1998, 34(4):293-299.
- [24] 张月琴, 陈耀锋, 王晶晶, 等. TDZ预处理及激素诱导对小麦茎尖丛生芽形成的影响 [J]. 麦类作物学报, 2014, 34(7):990-996.
- [25] AHMED M R, ANIS M. Changes in activity of antioxidant enzymes and photosynthetic machinery during acclimatization of micropropagated *Cassia alata* L. plantlets [J]. In vitro Cellular and Developmental Biology Plant, 2014, 139(1):1-9.
- [26] 高金山, 边庆华, 张永忠, 等. 细胞分裂素 CPPU 的研究进展 [J]. 农药, 2006, 45(3):151-154.

## Study on Factors Affecting Callus Initiation From *Bruguiera gymnorhiza* (L.) Savigny

LU Yanjun

(College of Forestry, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100)

**Abstract:** The factors affecting callus initiation from mangrove plant *Bruguiera gymnorhiza* was investigated with the young leaves as explant. Sterilization conditions, medium components, kinds of additive, different concentration of plant growth regulator combination were tested and callus induction rate was calculated. The results showed that 75% alcohol 30 seconds with 2% (volum fraction w/v) NaClO 20 minutes was the best condition of surface sterilization; amino acid (AA) medium was basic medium; browning rate was inhibited by heat-shock at 45 °C and ascorbic acid; AA medium + 0.50 mg · L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0.50 mg · L<sup>-1</sup> TDZ + 1.00 mmol · L<sup>-1</sup> vitamin C or AA medium + 0.50 mg · L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0.50 mg · L<sup>-1</sup> CPPU combination were optimal callus induction medium, in which over 50% of callus induction rate was obtained. Therefore, explant browning prevention and application of CPPU or TDZ as cytokinin were the key to success in callus induction from *Bruguiera gymnorhiza*.

**Keywords:** *Bruguiera gymnorhiza*; callus induction; explant browning; cytokinins